



**INOCULAÇÃO DO *Azospirillum* VIA SEMENTE OU PULVERIZAÇÃO ASSOCIADA  
A ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO *Brachiaria  
brizantha* CV. MARANDU**

**FERNANDO OLIVEIRA BARRETO**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INOCULAÇÃO DO *Azospirillum* VIA SEMENTE OU PULVERIZAÇÃO ASSOCIADA  
A ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO *Brachiaria  
brizantha* CV. MARANDU**

Orientador: Prof. Dr. Fabio Andrade Teixeira  
Coorientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniela Deitos Fries  
Coorientador (a): Prof. Dr. Daniel Lucas Santos Dias

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Setembro de 2021

**FERNANDO OLIVEIRA BARRETO**

**INOCULAÇÃO DO *Azospirillum* VIA SEMENTE OU PULVERIZAÇÃO ASSOCIADA  
A ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO *Brachiaria  
brizantha* CV. MARANDU**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Andrade Teixeira  
Coorientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Deitos Fries  
Coorientador (a): Prof. Dr. Daniel Lucas Santos Dias

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Setembro de 2021

633.2 Barreto, Fernando Oliveira.

B262i Inoculação do *Azospirillum* via semente ou pulverização associada a adubação nitrogenada sobre as características do *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. / Fernando Oliveira Barreto. - Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2021.  
58fl.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Fábio Andrade Teixeira e coorientação da Profª. D. Sc. Daniela Deitos Fries e Prof. D. Sc. Daniel Lucas Santos Dias.

1. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu - Inoculação do *Azospirillum*. 2. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu – Adubação nitrogenada. 3. Pastagens - Inoculação do *Azospirillum* - Adubação nitrogenada. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, Campus de Itapetinga. II. Teixeira, Fábio Andrade. III. Fries, Daniela Deitos. IV. Dias, Daniel Lucas Santos. V. Título.

**CDD(21): 633.2**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. *Azospirillum* brasileiro - Inoculação
2. Nitrogênio em pastagens - Produção
3. Inoculação do *Azospirillum* – Semente ou pulverização

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Aplicação do Azospirillum via semente ou foliar associada a adubação nitrogenada sobre as características do Brachiaria brizantha cv. marandu".

Autor (a): Fernando Oliveira Barreto

Orientador (a): Prof. Dr. Fábio Andrade Teixeira

Coorientador (a): Profª. Drª. Daniela Deitos Fries

Coorientador (a): Prof. Dr. Daniel Lucas Santos Dias

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Fábio Andrade Teixeira - UESB  
Orientador



Dr. Raul Castro Camiello Rosa – EMBRAPA



Drª. Kaliane Sírío Araújo – Pós-Doc IV



Dr. Carlos Alberto Alves de Oliveira Filho – INSTITUTO CNA



Prof. Dr. Daniel Lucas Santos Dias – UEFS

Data de realização: 02 de setembro de 2021.

“Pois apesar do estudo e sua sabedoria, quase tudo ele sabia, mas não sabia de tudo.”

*Wilson Aragão*

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

*Cora Coralina*

“Sabemos o que somos, mas não sabemos o que poderemos ser”.

*William Shakespeare*

“Ainda se vier noites traiçoeiras, se a cruz pesada for, Cristo estará contigo.”

*José Carlos Papae*

Aos meus pais, Flamarion e Edelzia, pelo carinho e amor, a quem devo tudo;

Aos meus irmãos, Eliane, Fabio e Flamarion, pelo estímulo e carinho;

Aos meus mestres, sem os quais não haveria a perpetuação do saber;

Aos meus amigos, pelo estímulo e bons momentos.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho, dando continuidade à minha formação profissional;

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior), pela bolsa de estudo;

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Zootecnia;

Ao Professor Dr. Fabio Andrade Teixeira, pela oportunidade de desenvolver um trabalho, possibilitando meu acesso ao conhecimento científico;

À minha família, pela credibilidade, incentivo, amor sincero e pelo exemplo de vida.

Aos amigos, pelo compartilhamento de ideias, e pelos alegres momentos de convivência;

Aos colegas da pós-graduação;

Aos funcionários da UESB;

A todos que passaram e passarão pela minha vida... Enfim, meus sinceros agradecimentos àqueles que contribuíram de forma positiva, direta ou indiretamente, na realização de mais um sonho.



## **BIOGRAFIA**

FERNANDO OLIVEIRA BARRETO, filho de Flamarion Reis Barreto e Edelzia Oliveira Barreto, nasceu em Jaguaquara, no Estado da Bahia, no dia 31 de maio de 1988. Em setembro de 2013 concluiu o curso de Zootecnia, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Em abril de 2015, Mestrado, área de concentração Produção de Ruminantes, também na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, realizando estudos na área de nutrição de ruminantes e manejo de pastagem. Em novembro de 2016, obteve aprovação para curso de Doutorado no PPZ-UESB, sob orientação do Professor Fábio Andrade Teixeira, com linha de pesquisa em Forragicultura e pastagens e tese defendida em 02 de setembro de 2021.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I – REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 <i>BRACHIARIA BRIZANTHA</i> CV. MARANDU.....	2
1.3 NITROGENIO EM PASTAGENS.....	3
1.4 FIXAÇÃO BIOCÓGICA DE NITROGENIO.....	5
1.5 <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> .....	7
1.6 REFERÊNCIAS .....	12
II – OBJETIVO .....	17
III – MATERIAL E MÉTODOS .....	18
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
EXPERIMENTO I.....	25
EXPERIMENTO II.....	40
V – CONCLUSÃO .....	52
VI – REFERÊNCIAS .....	53
VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> – Análise física e química da área experimental.....	18
<b>Tabela 2</b> – Produção de Massa seca de folha (Folha) (kg ha <sup>-1</sup> ) e relação folha/colmo (F/C) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....	27
<b>Tabela 3</b> – Volume de raiz (Vol. Raiz) (ml) e massa seca de raiz (MS raiz) (g/vaso) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....	28
<b>Tabela 4</b> – Composição bromatológica de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado...	30
<b>Tabela 5</b> – Fração B3 da proteína de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado. ....	32
<b>Tabela 6</b> – Teores de clorofila <i>a</i> (mg de clorofila.g <sup>-1</sup> de matéria fresca), clorofila <i>b</i> (mg de clorofila.g <sup>-1</sup> de matéria fresca) e razão <i>a/b</i> de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....	34
<b>Tabela 7</b> – Teores de globulina, prolamina e glutelina (mg.g <sup>-1</sup> ) em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....	35
<b>Tabela 8</b> – Açúcares solúveis totais (AST) em raiz, amido (Am) no colmo e amido na raiz em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado .....	37
<b>Tabela 9</b> - Taxa de alongamento de colmo (TAIC), taxa de alongamento foliar (TAIF), taxa de aparecimento foliar (TApF), Filocrono, comprimento final da folha (CFF) largura final de folha (LFF), altura do dossel (AD) e número total de folhas (NTF) em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....	37
<b>Tabela 10</b> – Razão área foliar (RAF) (dm <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> ) e razão peso foliar (RPF) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....	39

<b>Tabela 11</b> – Composição bromatológica de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da forma de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e uso da adubação nitrogenada.....	43
<b>Tabela 12</b> – Frações A, B1+B2, B3 e C da proteína de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da forma de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e uso da adubação nitrogenada.....	45
<b>Tabela 13</b> – Razão das clorofilas A/B de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da forma de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e uso da adubação nitrogenada.....	47
<b>Tabela 14</b> – Teores de prolamina e glutelina (mg.g <sup>-1</sup> de proteína) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da forma de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e uso da adubação nitrogenada.....	49
<b>Tabela 15</b> – Açúcares solúveis totais (AST) em folha e colmo, amido (Am) no colmo e raiz em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da forma de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e uso da adubação nitrogenada.....	50
<b>Tabela 16</b> – Área foliar (AF) (dm <sup>2</sup> ), área foliar específica (AFE) (dm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ), Razão área foliar (RAF) (dm <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> ) e razão peso foliar (RPF) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da forma de aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e uso da adubação nitrogenada.....	51

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1</b> - Reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoquem uma mudança na conformação dessa proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe- -proteína, e essa última reduz o N<sub>2</sub>. (De Dixon &amp; Wheeler, 1986; Buchanan et al., 2000.) Fonte: Taiz &amp; Zeiger, 2017.....</p>	6
<p><b>Figura 2.</b> Modelo ilustrativo para explicar os efeitos positivos a curto prazo da inoculação de sementes e plântulas com <i>Azospirillum</i> (um produtor de fitohormônios). Fonte: Adaptado de Cassan &amp; Dias-Zorita, 2016 .....</p>	9
<p><b>Figura 3.</b> Massa seca de colmo (A) e produção total (kg ha<sup>-1</sup>) (B) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	25
<p><b>Figura 4.</b> Matéria seca (MS) (A), proteína bruta (PB) (B) e fibra em detergente ácido (FDA) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	28
<p><b>Figura 5.</b> Fração B1 + B2 (A) e fração C (B) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	31
<p><b>Figura 6.</b> Valores de SPAD (A), teores de carotenoides (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) (B) e clorofilas totais (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) (C) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	32
<p><b>Figura 7.</b> Teor de Albumina (mg.g<sup>-1</sup>) em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	34
<p><b>Figura 8.</b> Açúcares solúveis totais (AST) na folha (A) e no colmo (B) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	36
<p><b>Figura 9.</b> Área foliar (AF) (dm<sup>2</sup>) (A) e índice de área foliar (IAF) (B) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> e fertilizante nitrogenado.....</p>	39

- Figura 10.** - Produção de massa seca de folha (Folha) (kg ha<sup>-1</sup>) (A), caule (kg ha<sup>-1</sup>) (B), produção total (kg ha<sup>-1</sup>) (C) e relação folha/colmo (F/C) (D) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 41
- Figura 11.** - Volume de raiz (Vol. Raiz) (ml) (A) e massa seca de raiz (MS raiz) (g/vaso) (B) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 43
- Figura 12.** - Teores de matéria mineral (MM) (A) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 43
- Figura 13.** - Índice SPAD (A) e teores clorofila A (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) (B), clorofila B (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) (C), carotenoides (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) (D) e clorofilas totais (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) (E) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 46
- Figura 14.** - Teores de albumina (mg.g<sup>-1</sup> de proteína) (A) e globulina (mg.g<sup>-1</sup> de proteína) (B) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 48
- Figura 15.** - Açúcares solúveis totais da raiz (AST raiz) (A) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 49
- Figura 16.** - Índice de área foliar (IAF) (A) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada..... 50

## RESUMO

BARRETO, Fernando Oliveira. INOCULAÇÃO DO *Azospirillum* VIA SEMENTE OU PULVERIZAÇÃO ASSOCIADA A ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DO *Brachiaria brizantha* CV. MARANDU. Itapetinga, BA: UESB, 2021. 58p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes)\*.

O uso da adubação assume importância fundamental na busca pela alta produção de forragem, principalmente o nitrogênio, que é o principal responsável pela formação dos tecidos vegetais. A associação de gramíneas com bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser uma alternativa capaz de contribuir para a nutrição de plantas trazendo benefícios na área sustentável ambiental e econômica. Dessa forma, foram realizados 2 experimentos para avaliar as características produtivas e fisiológicas do *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, inoculado ou não com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* (Azb). Este foi aplicado apenas via semente no experimento 1 e de duas formas (via semente e pulverizado) no experimento 2. Ambos os experimentos foram associados a doses de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 Kg/ha). Os experimentos foram realizados na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus Juvino Oliveira, Itapetinga (BA), em esquema fatorial 2 x 4 e delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições por tratamento. 48 vasos para cada experimento com capacidade de 12 kg de solo seco foram alocados em casa de vegetação. O solo utilizado para preenchimento dos vasos foi coletado na camada de 0-20 cm de profundidade, no Campus da Universidade. Foram utilizadas sementes convencionais de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Para os tratamentos com inoculante Azb via sementes, estas foram embebidas no produto na dose proporcional de 150 ml do inoculante para cada 10 kg de sementes. Para realizar a aplicação o produto foi diluído na proporção de 1,5 ml para 50 ml de água. Quando as plantas alcançaram 30 cm de altura foi realizado o corte de uniformização e logo em seguida a adubação nitrogenada via ureia de forma única. A aplicação do inoculante Azb via pulverização foi realizada 5 dias após o corte de uniformização, na dose de 600 ml/ha<sup>-1</sup>. 30 dias após o corte de uniformização foi feito o corte e desmanche dos vasos, então foram avaliadas as características produtivas e fisiológicas do *Brachiaria Brizantha* cv. marandu. **Experimento 1:** Houve interação para as variáveis produção de massa seca de colmo e produção total de forragem, sendo que independente da dose, a inoculação com Azb promoveu aumento na produção total. A produção de folha foi 8,29% maior para o tratamento que recebeu aplicação de Azb. O tratamento contendo o Azb teve maior relação folha/colmo. O uso do Azb levou a incremento em relação a todas as variáveis produtivas de parte aérea, independente da dose de adubação nitrogenada utilizada. Para volume de raiz houve diferença significativa em relação ao uso ou não do Azb, sendo que quando utilizado resultou em aumento. Já para a produção de massa seca de raiz não houve diferença significativa. A adubação nitrogenada resultou em crescimento linear tanto para volume de raiz quanto para massa seca de raiz. Verificou-se então, que a adubação nitrogenada elevou o teor de PB. A interação foi significativa para as frações B1+B2 e C das proteínas. A fração B1+B2 foram as que tiveram maiores teores em comparação as outras frações. O uso do Azb levou a um aumento de 6,66 e 13,56% para fração proteica A e B3

respectivamente. Já em relação à adubação nitrogenada as respostas foram quadráticas, sendo que a adubação aumentou o teor da fração A, assim como o uso do Azb. A interação foi significativa para as variáveis índice SPAD, carotenoides e clorofilas totais. Houve efeito significativo em relação ao uso do Azb para os teores de globulina, onde com o uso houve acréscimo de 20%. O uso do Azb aumentou os açúcares solúveis totais da raiz em 12,09%. Já em relação à adubação nitrogenada o aumento foi de 35,22 % na maior dose. A adubação nitrogenada levou a um aumento do amido do colmo e raiz. O uso do Azb acarretou aumento significativo para o variável número total de folhas sendo este de 12,51%. As doses de 80 e 120 kg de nitrogênio houve uma maior área foliar para o tratamento com o Azb.

**Experimento 2:** A interação foi significativa para a produção de folha, sendo maior quando o Azb foi aplicado via pulverização nas doses de 0, 40 e 120 kg de nitrogênio. A produção de caule foi maior na dose de 120 kg de Nitrogênio. Em relação à produção total da planta, observa-se maior produção quando o Azb foi aplicado de forma pulverizada independente da dose de nitrogênio aplicada. Houve interação significativa para volume de raiz e massa seca de raiz em função da forma de aplicação de Azb e uso do fertilizante nitrogenado. Quando o Azb foi aplicado de forma pulverizada os aumentos foram de 8,57 e 22,49% para as doses 80 e 120 nitrogênio respectivamente para volume de raiz. Para as variáveis matéria seca, fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína e fibra em detergente ácido houve redução nos teores quando o Azb foi aplicado de forma pulverizada, sendo que o contrário aconteceu com carboidratos não fibrosos. Em relação adubação nitrogenada ocorreu uma queda na fração C quando foi utilizada a adubação. A interação foi significativa para índice SPAD e teores clorofila a, clorofila b, carotenoides e clorofilas totais, sendo independente da forma de aplicação. Houve diferença significativa para glutelina, sendo maior 27% quando aplicado de forma pulverizada. Houve diferença significativa entre as formas de aplicação do Azb para açúcares solúveis totais na folha e colmo, com valores superiores quando a aplicação foi pulverizada. A maior área foliar foi observada quando o inoculante foi aplicado de forma pulverizada. Em concordância com a maior produção de folhas. O inoculante contendo bactérias *Azospirillum brasilense* pode ser associado ao uso da adubação nitrogenada, apresentando aumento na produção total do *Brachiaria brizantha* CV. Marandu até o máximo nível de adubação nitrogenada utilizado no presente trabalho. Sendo recomendado a forma de aplicação pulverizada.

**Palavras-chave:** clorofila; nitrogênio; produção; proteína

---

\* Orientador: Fabio Andrade Teixeira D.Sc. UESB, Co-orientador: Daniela Deitos Fries D.Sc. UESB e Coorientador: Daniel Lucas Santos Dias D.Sc. UEFS.



## ABSTRACT

BARRETO, Fernando Oliveira. **Inoculation of *Azospirillum* by seed or spraying associated with nitrogen fertilizer in the characteristics of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.** Itapetinga, BA: UESB, 2021. 58p. Thesis. (PhD in Animal Science, Area of Concentration in Ruminant Production).\*

The use of fertilizers plays a fundamental importance in the search for higher forage production, especially nitrogen that is the main one responsible for the formation of plant tissues. The association of grasses with nitrogen-fixing bacteria can be an alternative capable to contribute to plant nutrition, bringing benefits in environmental and economic sustainability. Thus, 2 studies were performed to evaluate the productive and physiological characteristics of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, inoculated or not with bacteria of gender *Azospirillum brasilense* (Azb). It was applied by seed in experiment 1 and in two ways (by seed and sprayed) in experiment 2. Both studies were associated with nitrogen rates (0, 40, 80 and 120 kg/ha). The studies were carried out at the Southwest State Bahia University, Juvino Oliveira campus, Itapetinga (BA), in a 2 x 4 factorial scheme in a completely randomized design (CRD), with 4 replications per treatment. It was used 48 plant vases for each experiment with a 12 kg capacity of soil were placed in a greenhouse. The soil utilized to fill the plant vases was collected in the 0-20 cm depth layer, at the University Campus. It was used conventional seeds of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. For treatments with Azb inoculant by seeds, these were soaked on the product in a proportional dose of 150 ml of the inoculant for every 10 kg of seeds. To carry out the application, the product was diluted in the proportion of 1.5 ml to 50 ml of water. When the plants reached 30 cm high, the standard cut was carried out and soon after the nitrogen fertilizer by urea in a unique way. The application of the inoculant Azb by spraying was carried out 5 days after the standardization cut, at a dose of 600 ml/ha<sup>-1</sup>. 30 days after the standardization cut, the plant vases were cut and break, then the productive and physiological characteristics of *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu were analyzed. **Study 1:** It was observed interaction for the variables stem dry mass production and total forage production, and regardless of the dose, inoculation with Azb promoted an increase in total production. Leaf production was 8.29% higher for the treatment with Azb application. The treatment containing Azb had the highest leaf/stem ratio. The application of Azb led to an increase in relation to all productive variables of shoots, regardless of the nitrogen fertilizer rate applied. For root volume, there was a significant difference in relation to the application or not of Azb, and when it was applied it resulted in an increase. As for the production of dry root mass, there was no significant difference. Nitrogen fertilizer resulted in linear growth for both root volume and root dry mass. It was then verified that nitrogen fertilizer increased the CP content. The interaction was significant for the B1+B2 and C fractions of the proteins. The fraction B1+B2 had the highest contents compared to the other fractions. The use of Azb led

to an increase of 6.66 and 13.56% for protein fraction A and B3 respectively. The nitrogen fertilizer, the responses were quadratic, and fertilizer increased the content of fraction A, as well as the application of Azb. The interaction was significant for the variables SPAD (Soil Plant Analysis Development) index, carotenoids and total chlorophylls. There was a significant effect in relation to the application of Azb for the levels of globulin, with the use there was an increase of 20%. The use of Azb increased total soluble sugars in the root by 12.09%. In relation to nitrogen fertilizer, the increase was 35.22% at the highest dose. Nitrogen fertilizer led to an increase in stalk and root starch. The use of Azb resulted in a significant increase for the variable total number of leaves, which was 12.51%. The doses of 80 and 120 kg of nitrogen showed a greater leaf area for the treatment with Azb. **Study 2:** The interaction was significant for leaf production, being greater when Azb was applied by spraying at doses of 0, 40 and 120 kg of nitrogen. Stem production was higher at the dose of 120 kg of Nitrogen. In relation to the total production of the plant, a higher production was observed when Azb was applied in a pulverized form, regardless of the applied nitrogen dose. There was a significant interaction for root volume and root dry mass as a function of the form of Azb application and use of nitrogen fertilizer. When Azb was sprayed, the increases were 8.57 and 22.49% for doses 80 and 120 nitrogen, respectively, for root volume. For the variables dry matter, neutral detergent fiber corrected for ash and protein and acid detergent fiber there was a reduction in the contents when Azb was applied in a powdered form, whereas the opposite happened with non-fibrous carbohydrates. Regarding nitrogen fertilizer, there was a drop in fraction C when fertilizer was used. The interaction was significant for SPAD index and chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids and total chlorophyll contents, regardless of the form of application. There was a significant difference for glutelin, being 27% higher when applied as a powder. There was a significant difference between the forms of Azb application for total soluble sugars in the leaf and stem, with higher values when the application was sprayed. The largest leaf area was observed when the inoculant was sprayed. In agreement with the higher production of leaves. The inoculant containing *Azospirillum brasilense* bacteria can be associated with the application of nitrogen fertilizer, as it demonstrated an increase in the total production of *Brachiaria brizantha* CV. Marandu until the maximum level of nitrogen fertilizer used in the present study. The sprayed form of application is recommended.

**Keywords:** chlorophyll; nitrogen; production; protein

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Introdução

O Brasil se localiza quase em sua totalidade, na região tropical, sendo assim favorecido com condições climáticas propícias a altas produções de forragem. Tornando as pastagens de grande importância na alimentação animal.

No entanto, em grande parte dos sistemas de produção, as forrageiras têm apresentado baixa produção graças ao empobrecimento do solo, em razão do esgotamento dos nutrientes removidos no processo produtivo, e que não foram repostos ao longo dos muitos anos de exploração (Vasconcelos, 2006). A baixa disponibilidade de nutrientes no solo e manejo inadequado são as principais causas de queda na produtividade das pastagens. Assim, o uso da adubação assume importância fundamental na busca pela alta produção de forragem, principalmente o nitrogênio, que é o principal responsável pela formação dos tecidos vegetais (Fagundes et al., 2006). Porém, os fertilizantes nitrogenados têm um alto custo, o que acaba onerando a produção. Aliado ao alto custo de produção tem-se a preocupação com uma produção mais sustentável, levando à busca por alternativas para reduzir o impacto ao meio ambiente causado por fertilizantes químicos (Costa et al., 2015).

O manejo do solo e a exploração da biodiversidade dos sistemas agrícolas têm sido utilizados para otimizar a produção e a sustentabilidade dos ecossistemas. A associação de gramíneas com bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser uma alternativa capaz de contribuir para a nutrição de plantas trazendo benefícios na área sustentável ambiental e econômica, podendo diminuir a utilização de adubos nitrogenados, e garantir altas taxas de produtividade (HUNGRIA et al., 2010). Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio, o gênero *Azospirillum* é um dos mais bem estudados, sendo capaz de colonizar centenas de espécies de plantas e melhorar seu crescimento, desenvolvimento e produtividade, seja através da fixação de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios (Cassan & Dias-Zorita, 2016).

Hungria et al., (2016), em experimentos realizados em três diferentes áreas geográficas do Brasil, onde os tratamentos consistiram em: sem adubação nitrogenada (N), sem inoculação de *Azospirillum*; adubação N (40 kg de N ha<sup>-1</sup>), sem inoculação, e combinação de adubação N (40 kg de N ha<sup>-1</sup>) e inoculação, encontraram aumentos significativos

independente da área geográfica na produção de biomassa de *Brachiaria brizantha* e *ruzizienses* quando o *Azospirillum* foi associado com a adubação nitrogenada. Chegando a um aumento médio de 22,1% quando houve a associação, já quando foi utilizado apenas a adubação nitrogenada o aumento foi de 5,4%. Aguirre et al., (2018) trabalhando com inoculação de *Azospirillum* e adubação (0, 100 e 200 kg de N ha<sup>-1</sup>) em *Coastcross*, também relatam aumentos na produção nos tratamentos que receberam inoculação, porém, quando não associado a adubação nitrogenada. O mesmo foi relatado por Oliveira et al. (2007), em experimento com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu na presença ou ausência da inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio (0, 150, 200 e 300 kg.ha<sup>-1</sup>), eles afirmam que a inoculação das sementes aumentou em 6% a produção de forragem no primeiro corte. Porém, quando se aplicou nitrogênio na pastagem não houve efeito da inoculação.

Dessa forma, surge o interesse crescente no uso de inoculantes bacterianos em gramíneas perenes. Onde há a hipótese de que fixação biológica de nitrogênio através de bactérias diazotróficas como, *Azospirillum Brasilense* (Azb), é uma alternativa eficaz para diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados e aumentar a produção de forragem. Mas, o sinergismo entre a inoculação com *Azospirillum Brasilense* e adubação nitrogenada ainda não está esclarecido. Neste sentido, este estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação e da adubação nitrogenada sobre as características produtivas e fisiológicas na *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

## **1.2 *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

O gênero *Brachiaria* possui cerca de 100 espécies, sendo em grande parte de origem Africana. A primeira espécie introduzida oficialmente no Brasil em 1952 foi a *Brachiaria decumbens*, porém foi a partir de 1965 que o gênero conseguiu ser reconhecido, com a chegada de espécies como a *Brachiaria ruzizienses* e *Brachiaria brizantha* (Valle, 1990). A *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pelas suas características agrônômicas e índices zootécnicos ocupa extensas áreas no Brasil. Como características, apresenta alta produção de matéria seca, boa adaptabilidade aos mais diversos climas e solos do país, facilidade de estabelecimento, persistência e bom valor nutritivo, apresenta poucos problemas de doenças, além de mostrarem bom crescimento durante a maior parte do ano, inclusive no período seco (Valério, 2009).

A *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foi lançada pela Embrapa em 1984, tendo origem em uma região vulcânica da África, e vinda da Estação Experimental de Forrageiras de

Marandellas, no Zimbábue (Lucena, 2011). O capim marandu é uma planta do ciclo fotossintético do tipo C4, com crescimento cespitoso. Os colmos iniciais são prostrados, produzindo, entretanto, perfilhos predominantemente eretos, sendo os colmos floríferos e o perfilhamento nos nós superiores. Os seus rizomas são curtos e encurvados. As bainhas apresentam pilosidades e cílios nas margens, geralmente mais longas que os entrenós, escondendo os nós. As lâminas foliares possuem pilosidade na parte superior e inferior (Camarão & Filho, 2005). O florescimento é bem acentuado, ocorrendo no final do verão, nos meses de fevereiro e março. Apresenta os dois tipos de resistência às cigarrinhas da pastagem, a antibiose (ação adversa da planta sobre a biologia do inseto) e a antixenose (a planta apresenta características físicas que dificultam a ação do inseto), o que a torna a cultivar de *Brachiaria* resistente a cigarrinhas das pastagens (Valle et. al., 2010).

O Marandu tem apresentado produtividade bem distribuída no ano e uma alta produção de massa seca de forragem, mantendo o solo bem coberto devido ao seu rápido estabelecimento. Assim, sendo bastante competitiva com invasoras. Recomenda-se que o corte seja efetuado entre 20 e 30 cm, para facilitar o rebrote da planta (Costa et al., 2001). Segundo Vilela (2005), o valor nutritivo do Marandu varia de acordo com sua idade, assim, com 60 dias de crescimento, possui 29,5% de matéria seca (MS), 10,5% de proteína bruta (PB) e produtividade média, varia entre 10 a 17 toneladas de MS/ha/ano.

### **1.3 Nitrogênio em pastagens**

O Nitrogênio é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, estando presente na composição de diversas moléculas e também nas atividades bioquímicas (ATP, NADH, NADPH, clorofilas, aminoácidos, proteínas, enzimas e coenzimas), sendo então um componente limitante para diversas culturas, principalmente gramíneas forrageiras, representando geralmente de 20 a 40 g kg<sup>-1</sup> da MS dos tecidos vegetais (Taiz & Zeiger, 2017). Dentre os nutrientes, o nitrogênio é o principal responsável pelo aumento da produção de forragem. De acordo com Cecato et al. (2000), o nitrogênio induz processos metabólicos, os quais resultam em benefícios acentuados na produção de matéria seca e energia para as gramíneas, promovendo um crescimento diferenciado de órgãos e sistemas.

As gramíneas tropicais apresentam elevado potencial de resposta à adubação nitrogenada, sendo que respostas lineares de produção são encontradas até doses consideradas elevadas (400 a 600 kg ha<sup>-1</sup>) (Bernadi et al., 2018; Campos et al., 2016). Esse nutriente tem influência marcante nos componentes estruturais das plantas, como tamanho das folhas e do

colmo, emissão e desenvolvimento dos perfilhos, sendo o principal constituinte das proteínas (Freitas, 2009, Rosado; Gontijo, 2017). Além dos benefícios supracitados, a reposição do nitrogênio é capaz de garantir também melhorias no valor nutritivo da forragem (Marques et al., 2016).

O nitrogênio pode ser obtido através de processos naturais ou através do processo industrial. Os processos naturais para a obtenção nitrogênio prontamente disponível para as plantas são através do relâmpago, reações fotoquímicas ou por meio da fixação biológica de nitrogênio. Os relâmpagos convertem o vapor de água e o oxigênio em radicais hidroxilas livres altamente reativos, em átomos de hidrogênio livre e em átomos de oxigênio livre, que atacam o nitrogênio molecular ( $N_2$ ), formando o ácido nítrico ( $HNO_3$ ). Posteriormente, esse ácido nítrico precipita-se sobre a Terra com a chuva. As reações fotoquímicas acontecem entre o óxido nítrico gasoso ( $NO$ ) e o ozônio ( $O_3$ ), produzindo o ácido nítrico ( $HNO_3$ ) (Taiz & Zeiger, 2017). Outra maneira de obtenção do nitrogênio via processo natural é através da fixação biológica de nitrogênio (cerca de 90% do nitrogênio fixado por processos naturais), em que bactérias ou cianobactérias (algas azuis) fixam o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ). Essa amônia dissolve-se na água e forma o amônio ( $NH_4^+$ ) (Taiz & Zeiger, 2017).

Já para processo industrial é necessário temperaturas elevadas (cerca de  $200^\circ C$ ) e pressão alta (cerca de 200 atmosferas), e a presença de um metal catalisador (geralmente ferro), então o  $N_2$  combina-se com hidrogênio para formar amônia. Essa reação de fixação de nitrogênio é conhecida como processo Haber-Bosch, sendo o ponto de partida para a fabricação de muitos produtos industriais e agrícolas (Taiz & Zeiger, 2017). No entanto, esse processo é de alto custo o que leva o processo de adubação a um alto valor agregado. O processo industrial também acarreta no aumento no consumo de energia fóssil, ou seja, uma energia não renovável, além de emissões de gases de efeito estufa do solo, sendo o mais importante, o óxido nitroso ( $N_2O$ ) (Harrison & Web, 2001; Dobbie & Smith, 2003).

O nitrogênio é absorvido do solo por meio das raízes, na forma de Nitrato ( $NO_3^-$ ) e amônio ( $NH_4^+$ ), o amônio pode ser incorporado e utilizado pelas plantas em função da ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato oxo-glutarato amino sintetase (GOGAT) ou ainda glutamato desidrogenase (GDH), que produzem o aminoácido glutamato (ácido glutâmico) e, a partir deste incorporados na parte aérea formando compostos nitrogenados e auxiliando a fixação de carbono. Já o nitrato uma vez absorvido pelas raízes, na célula, pode ser reduzido a nitrito através da enzima redutase do nitrato e, então, convertido a amônio através da enzima redutase do nitrito. (Taiz & Zeiger, 2017, Bredemeier & Mundstock., 2000).

Segundo os levantamentos de trabalhos com uso de adubação nitrogenada em cobertura feitos por Andrade et al. (2011), os autores observaram que é possível aumentos de até mais de 100% na massa seca de forragem de *Brachiaria*, quando adubadas com nitrogênio. Soares Filho et al. (2016) propõem para as gramíneas, em sistemas menos intensivo, uma aplicação de 60 a 100 kg ha<sup>-1</sup> de N, enquanto para os sistemas de produção mais intensivos, recomendam a aplicação de 100 a 200 kg ha<sup>-1</sup> de N. Cecato et al. (2000) adubando em níveis crescentes de nitrogênio (0, 100, 200 e 600 kg ha<sup>-1</sup>) o *Brachiaria brizantha* cv. Marandu observaram o aumento na produção de matéria seca a medida que se elevou a dose de nitrogênio. Já Santos Jr et al. (2000), trabalhando com *Brachiaria decumbens*, observaram que a utilização de nitrogênio além de proporcionar aumento na produção de matéria seca da parte aérea, elevou também a produção de raízes. Esse aumento na produção de raízes é benéfico, pois a planta abrange uma maior área de captação de água e nutrientes, com conseqüente maior absorção de nutrientes. O trabalho desenvolvido por Fagundes et al. (2005) corrobora a afirmativa supracitada, quando ao avaliarem uma pastagem de *Brachiaria decumbens* em pastejo contínuo com doses crescentes de nitrogênio (75, 150, 225 e 300 kg ha<sup>-1</sup>), observaram aumento linear na produção da biomassa de raiz.

#### **1.4 Fixação biológica de nitrogênio**

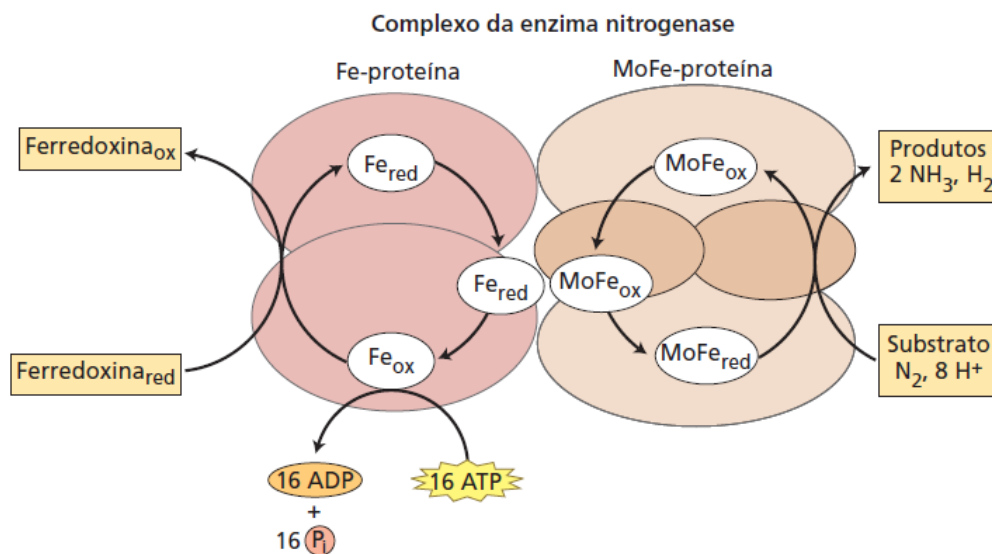
A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por algumas bactérias chamadas de diazotróficas, entre as mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Esses organismos representam a forma mais importante de fixar o nitrogênio atmosférico, pois contribui com a maior parte do nitrogênio fixado atualmente no planeta (Cardoso & Andreote, 2016).

As bactérias diazotróficas podem estabelecer simbiose as com diferentes espécies vegetais, estas são capazes de criar nódulos, que são estruturas especializadas, localizadas nas raízes de plantas leguminosas. A maioria das bactérias diazotróficas são de vida livre no solo, ocorrendo em todos os tipos de solo. As diazotróficas podem ainda estar associadas a espécies vegetais, vivendo endofiticamente nas raízes e parte aérea, (Moreira et al., 2010). Independente do tipo de interação, todas as bactérias diazotróficas tem o mesmo sistema de fixação de nitrogênio, baseado na redução do nitrogênio atmosférico à amônia pela ação da enzima nitrogenase (Cardoso & Andreote, 2016).

Dentre os microrganismos diazotróficos, os de vida livre além de serem os mais abundantes foram os primeiros a serem reconhecidos. No Brasil, trabalhos pioneiros

realizados pela Dra. Johanna Döbereiner, resultaram no isolamento das espécies *Beijerinikia fluminensis* e *Beijerinikia indica* da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em solos tropicais (Döbereiner; Ruschel, 1958; Burris, 1975).

Como já foi supracitado o complexo nitrogenase é responsável pela conversão do  $N_2$  para  $NH_3$  (Hardy et al., 1986) forma assimilável pelos seres vivos. O processo é realizado na ausência de oxigênio, usando ATP (adenosina trifosfato) (Masepohl & Kranz, 2009). A nitrogenase tem como componentes estruturais o ferro (Fe) e molibdênio (MO) ou vanádio (V), formando assim uma ferro-proteína (Fe-proteína) e uma Molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína), e para que a reação aconteça, é necessário haver um transporte de elétrons, a Fe-proteína que coleta a força redutora e energia, e contém o sítio ativo da redução do  $N_2$ , já a MoFe-proteína coleta e reduz o substrato (Raymond et al., 2004), ambas são capazes de transportar elétrons. Ainda durante a reação de redução do  $N_2$ , a enzima nitrogenase é auxiliada por uma outra molécula componente que transporta elétrons, a erredoxina que é uma proteína ferro-enxofre que intermedeia a transferência de elétrons (Vinhal-Freitas & Rodrigues, 2010) (Figura 1).



**Figura 1** - Reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoquem uma mudança na conformação dessa proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe- -proteína, e essa ultima reduz o  $N_2$ . (De Dixon & Wheeler, 1986; Buchanan et al., 2000.) Fonte: Taiz & Zeiger (2017).

Em gramíneas, a FBN é realizada por alguns gêneros de microrganismos tais como: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* (Baldani et al., 1999). Esses



microrganismos já têm demonstrado seu potencial de fixação, e também, a capacidade de sintetizar fitohormônios e seus análogos, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (Melo, 1998), promovendo incremento no crescimento de plantas de diferentes espécies com ênfase no uso das gramíneas forrageiras (Reis Junior et al., 2004) e, principalmente, por aumento da exploração da área radicular, atuando na maior absorção de nutriente e água, mesmo em condições de baixo suprimento de nutrientes e umidade (Bastian et al., 1998).

### **1.5 *Azospirillum brasilense* (Azb)**

Entre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, o gênero *Azospirillum* é um dos mais estudados atualmente, principalmente em gramíneas perenes. Sendo este microrganismo capaz de colonizar mais de cem espécies de plantas e melhorar significativamente seu crescimento, desenvolvimento e produtividade (Bashan & de-Bashan, 2010).

A Azb foi desenvolvida pela Embrapa Soja de Londrina em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR). As bactérias do gênero *Azospirillum* são fixadoras de nitrogênio atmosférico de vida livre e podem habitar o interior dos tecidos das plantas quando presentes na rizosfera. Essa associação acarreta no aumento do desenvolvimento e na produção de biomassa vegetal, principal interesse quando se trata de pastagens, já que o acúmulo de forragem é o objetivo principal da produção. Na rizosfera, bactérias do gênero *Azospirillum* podem também auxiliar as plantas por meio da secreção de hormônios (Oliveira et al., 2002).

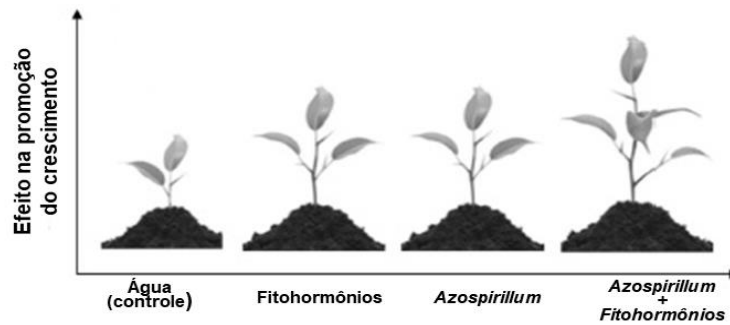
Apesar da especificidade com relação ao seu hospedeiro ser baixa, a associação dessas bactérias fixadoras de nitrogênio é mais frequente com gramíneas (Baldani et al., 1999), sendo presentes em todos tipos de solos. Essas bactérias possuem diâmetro de 1 µm, comprimento de 2,1 a 3,8 µm (Silva et al., 2004), formato curvo, são móveis e de variadas origens geográficas (Huergo, 2006) e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 28 e 41 °C, dependendo da espécie (Eckert et al., 2001).

Para selecionar estirpes de *Azospirillum* pesquisadores testaram as que melhor sobreviviam e desenvolviam no solo, adaptavam-se as tecnologias empregadas e promoviam maior crescimento de planta. Estes resultaram na autorização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) da produção de inoculantes comerciais das estirpes de Azb, Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para a cultura do milho.

A ocorrência e a atividade dessas bactérias no solo e na planta são fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura), químicos (acidez e baixos teores de nutrientes) e biológicos (espécie vegetal não hospedeira) podendo reduzir o número de unidades formadoras de colônia (UFC) (Baldani et al. 1999). Nesse sentido, a colonização do interior dos tecidos das plantas, chamada de associação endofítica, pode ter grande vantagem em relação às bactérias associadas a rizosfera (Lodewyckx et al., 2002). Pois, o interior dos tecidos vegetais fornece um ambiente protegido de condições ambientais extremas encontradas no solo. Além disso, a troca de metabólitos na associação endofítica é mais direta quando comparada com a rizosfera (Vinha-Freitas & Rofrigues, 2010).

Além da fixação de nitrogênio, outro mecanismo proposto para explicar a promoção do crescimento de plantas inoculadas, tem sido relacionado à sua capacidade de produzir e metabolizar vários fitohormônios e outras moléculas reguladoras do crescimento das plantas (Tien et al., 1979). Há evidências de que a excreção de fitohormônios pela bactéria é pelo menos parcialmente responsável pelos efeitos positivos observados na morfologia e atividade da raiz (Fallik et al. 1994). Cassán et al. (2009) verificaram que o inoculante à base de bactérias Azb promoveu o crescimento inicial de plântulas de milho e soja, sendo observado que as que bactérias foram capazes de produzir auxina (AIA), giberelina e citocinina em ensaios com meio de cultura líquido. Os efeitos positivos do Azb nas plantas, além dos ligados ao aporte de nitrogênio, são principalmente atribuídos ao desenvolvimento radicular melhorado e, conseqüente, aumento na taxa de absorção de água e minerais (Okon & Vanderleyden, 1997).

Embora muitos mecanismos tenham sido descritos para explicar a promoção do crescimento de plantas por *Azospirillum* sp., um único mecanismo parece não ser responsável pelo efeito total. Os modos de ação poderiam ser melhor explicados pela “hipótese aditiva”, que permite explicar os efeitos promotores de crescimento da planta devido à inoculação. Esta hipótese foi sugerida há mais de 20 anos (Bashan & Levanony, 1990) e considera mecanismos múltiplos, como ação na fixação de nitrogênio e a produção de fitohormônios (figura 1).



**Figura 2.** Modelo ilustrativo para explicar os efeitos positivos a curto prazo da inoculação de sementes e plântulas com *Azospirillum* (um produtor de fito-hormônios). Fonte: Adaptado de Cassan e Dias-Zorita, 2016.

Os grupos mais importantes de hormônios vegetais produzidos pelo *Azospirillum* são: Auxinas, essencial ao crescimento vegetal, a sua sinalização funciona praticamente em cada aspecto do desenvolvimento. São produzidos vários tipos de auxinas pelas plantas, a mais conhecida é o ácido indolilacético (AIA). Pedrinho et al (2010), testando a capacidade da solubilização de fosfato e a produção de ácido indol acético (AIA) de bactérias que habitam a rizosfera de plantas de milho, observou produção de AIA pelo gênero *Azospirillum*, e que nas linhagens de *Azospirillum brasilense* constataram níveis mais elevados em relação às linhagens de *Azospirillum lipoferum*. Estas auxinas desempenham diversas funções na fisiologia do vegetal, como: crescimento do caule e da raiz, este ocorre através do processo de alongamento das células vegetais. Quando a planta apresenta baixa quantidade de auxinas, suas raízes podem crescer, porém o caule não se desenvolve. Já a alta concentração de auxinas pode provocar o crescimento do caule, deixando as raízes pouco desenvolvidas; Dominância apical, auxinas fabricadas pelo meristema apical do caule diminuem a atividade das gemas axilares que ficam perto do ápice. Quando a gema apical é extraída da planta, ocorre o surgimento de ramos, folhas e flores laterais; Tropismos, as auxinas atuam no controle dos tropismos (movimentos relacionados ao crescimento das plantas de acordo com estímulos da natureza) (Taiz & Zeiger, 2017).

As citocininas outro grupo de hormônios foram descobertas em uma pesquisa sobre fatores que estimulavam a divisão de células vegetais em combinação com a auxina. As citocininas têm efeitos em muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo a senescência foliar, a dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento gametofítico, a promoção da atividade de dreno, o desenvolvimento vascular e a quebra da dormência da gema. Além disso, as citocininas desempenham papéis

importantes na interação das plantas com fatores bióticos e abióticos, abrangendo os estresses salino e pela seca, os macronutrientes (incluindo nitrato, fósforo, ferro e sulfato), as relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares, bem como bactérias patogênicas, fungos, nematóides e vírus (Taiz & Zeiger, 2017).

Já as giberelinas têm efeito na promoção do alongamento celular, sendo responsáveis pela indução do alongamento do entrenó em plântulas anãs. Elas exercem diversos papéis durante o ciclo de vida da planta: por exemplo, elas podem promover a germinação de sementes, a transição para o florescimento, o desenvolvimento do pólen e o crescimento do tubo polínico, além do desenvolvimento do fruto. Os órgãos que apresentam maior concentração de giberelinas são sementes em germinação, endosperma, frutas imaturas e ápices de caules e raízes e, por isso, estes órgãos sejam os prováveis locais de síntese deste grupo de reguladores (Taiz & Zeiger, 2017).

O uso de microrganismos diazotróficos é realizado através de um formulado em formato de inoculante, que segundo Cardoso & Andreoti (2016) é um material contendo microrganismos e que atua no desenvolvimento da planta, seja ele líquido ou em forma de turfa. As recomendações da RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) para que um inoculante possa ser comercializado são: o produto deve apresentar  $1 \times 10^9$  células viáveis por grama ou mililitro do produto até a data do seu vencimento; deve ser elaborado em um suporte ou veículo estéril e estar livre de microrganismos não especificados em fator de diluição  $1 \times 10^{-5}$ , sendo que o veículo deve fornecer todas as condições de sobrevivência ao microrganismo (Cardoso & Andreoti, 2016).

A inoculação em culturas de campo é realizada principalmente através do tratamento de sementes antes da semeadura, buscando garantir uma colonização precoce aumentando a chance de efeitos benéficos sobre a cultura (Cassan & Dias-Zorita, 2016). Outra forma de aplicação utilizada é através da pulverização no solo ou foliar em cobertura. Fukami et al. (2016) compararam métodos de inoculação via sulco, pulverização do solo na semeadura e pulverização foliar e relataram que a aplicação foliar melhorou a colonização das folhas, enquanto a inoculação do solo favoreceu a colonização das raízes e da rizosfera. Os autores ainda relatam efeitos positivos da inoculação no volume das raízes e altura das plantas e perfilhos por planta quando o inoculante foi pulverizado. É necessário ter atenção em relação às condições de temperatura, não deixando o inoculante exposto ao sol, também deve-se ter devida atenção a a aplicação conjunta com agroquímicos (Hungria et al., 2010).

Hungria et al. (2016), avaliaram pastagens de *Brachiaria* spp. (*B. brizanta* e *B. ruziziensis*) por dois anos e observaram um aumento médio 22,1 % da produção de biomassa, quando as pastagens foram fertilizadas com 40 kg N ha<sup>-1</sup> e associada com inoculação com Azb comparada à produção em pastagens sem adubação nitrogenada e não inoculada.

## 1.6 Referências

- AGUIRRE PF, OLIVO CJ, RODRIGUES PF, FALK DR, ADAMS CB, SCHIAFINO HP. Forage yield of Coastcross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences** 40, 1–8. 2018.
- ANDRADE, C. M. S.; FERREIRA, A. S.; FARRINATTI, L. H. E. Tecnologias para intensificação da produção animal em pastagens: fertilizantes x leguminosas. In: **Simpósio sobre o manejo de pastagem**. Piracicaba, SP. Anais... Piracicaba, SP: FEALQ. p.85-138. 2011.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S; BALDANI, V.L.D. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, p.621-650. 1999.
- BASHAN, Y., LEVANONY, H., CURRENT. Status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology** 36, 591 e 608. 1990.
- BASHAN, Y., DE-BASHAN, L., How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth. **A critical assessment. Advances in Agronomy** 108, 77e136. 2010.
- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3 acetic and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in **chemically-defined culture media**. *Plant Growth Regulation*, Netherlands, v.24, p.7-11, 1998.
- BERNARDI, A.; SILVA, A.W.L.; BARETTA, D. Estudo metanalítico da resposta de gramíneas perenes de verão à adubação nitrogenada. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.2, p.545-553, 2018.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p.365-372, 2000.
- BURRIS R.H. The acetylene reduction technique. In: Nitrogen fixation by free-living microorganisms. D.P.Stewart ed. **International Biological Programme**. v.6, p. 249-258. Cambridge Univ. Press., New York, 1975.
- CAMARÃO, A.P.; FILHO, A.P.S.S. Documentos 211. Limitações e Potencialidades do capim braquiarião (*Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* (A. Rich) Stapf) para a Amazônia. **EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** ISSN 1517-2201, p.11. 2005.
- CAMPOS, F.P.; NICÁCIO, D.R.O.; SARMENTO, P. et al. Show more Chemical composition and in vitro ruminal digestibility of hand-plucked samples of Xaraes palisade grass fertilized with incremental levels of nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**. v.215, p.1-12, 2016.
- CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; ANDREOTE, Fernando Dini. Microbiologia do solo. [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: DOI: 10.11606/9788586481567.

CASSÁN F.; DIAZ-ZORITA M *Azospirillum sp.* in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biol Biochem** 103:117–130. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.45, n.1, p.28–35, 2009b.

CECATO, U.; MACHADO, A.O.; MARTINS, E.N.; PEREIRA, L.A.F.; BARBOSA, M.A.A.F.; SANTOS, G.T. Avaliação da produção e de algumas características da rebrota de cultivares e acessos de *Panicum maximum* Jacq. sob duas alturas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.660-668, 2000.

CORSI, M. Espécies forrageiras para pastagem. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J. C. de.; FARIA, V.P. de. (eds). PASTAGEM – FUNDAMENTOS DA EXPLORAÇÃO RACIONAL, Piracicaba, FEALQ-USP. p.225-254. 1994.

COSTA, N.L.; TOWNSEND, C.R.; MAGALHÃES, J.A.; PEREIRA, R.G.A. Manejo de pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em Rondônia. Rondônia: CPAFRO EMBRAPA, 2001. 2p. (Relatório Técnico, 33).

COSTA, R. R. G. F., QUIRINO, G. S. F., NAVES, D. C. F., SANTOS, C. B., & ROCHA, A. F. S.. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 45(3), 304-311. (2015)

DIAS-FILHO, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2014. 36p. (Documentos, 402).

DÍAZ-ZORITA, M., FERNÁNDEZ-CANIGIA, M.V., BRAVO, O.A., BERGER, A., SATORRE, E.H., 2015. Field evaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum sp.* In: Cassán, F.D., Okon, Y., Creus, C.M. (Eds.), Handbook for *Azospirillum*, **Technical Issues and Protocols**. Springer Int. Publishing, Switzerland, pp. 435e445.

DOBBIE, K. E.; SMITH, K. A. Nitrous oxide emission factors for agricultural soils in Great Britain: the impact of soil water-filled pore space and other controlling variables. **Global Change Biology**, v. 13, n. 2, p. 204-218. 2003

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v. 1, p. 261-272, 1958.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. *Brachiaria brizantha* v. Marandu. Campo Grande, 1985. 31p. (EMBRAPA/CNPQC. Documentos, 21).

FAGUNDES, J. L.; FONSECA, D. D.; MISTURA, C.; MORAIS, R. D.; VITOR, C. M. T.; GOMIDE, J. A.; NASCIMENTO JÚNIOR D. do; CASAGRANDE D. R. & COSTA, L. T.

da. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiária em pastagem adubada com nitrogênio avaliadas nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 21-29, 2006.

FAGUNDES, J.L.; FONSECA, D.M.; GOMIDE, J.A. Acúmulo de forragem em pastos de *Brachiaria decumbens* adubados com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.397-403, 2005.

FALLIK, E.; SARIG, S.; OKON, Y. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton : CRC, 1994. p.77-85.

FREITAS, F. P. Produtividade e valor nutritivo do capim-Tanzânia com diferentes densidades de plantas e doses de Nitrogênio. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG**, 2009.

FUKAMI, J., NOGUEIRA, M.A., ARAUJO, R.S., HUNGRIA, M., 2016. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express** 6 (3), 13. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>.

HARDY, Y.; M. MAINVILLE AND D.M. SCHMITT. 1986. An atlas of spruce budworm defoliation in eastern North America, 1938–1980. **United States Department of Agriculture**, Forest Service Miscellaneous Publication 1449.

HARRISON, R.; WEBB, J. A review of the effect of N fertilizer type on gaseous emissions. **Advances in Agronomy**, v. 73, p. 65-108. 2001

HUERGO, L.F. Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense*. 170f. 2006. (Tese - Doutorado em Bioquímica). **Universidade Federal do Paraná, Curitiba**.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil, Netherlands**, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M. A., & ARAÚJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*: Na environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, (2016). 221(1), 125-131.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.S.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in **Brazil**. **Plant Soil**, v. 331, n.1-2, p. 413–425, 2010. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.

LODEWYCKX, C., VANGRONVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E.R.B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M. AND LELIE, D.V. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences** 21, 586–606.

LUCENA, M.A.C. Instituto de Zootecnia. Programa de pós-graduação em produção animal sustentável. Características agrônômicas e estruturais de *brachiaria spp* submetidas a doses e fontes de nitrogênio em solo de cerrado, p.5. 2011.



MARQUES, M.F. et al. Momento de aplicação do nitrogênio e algumas variáveis estruturais e bromatológicas do capim-massai. **Arq. Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.68, n.3, p.776-784, 2016.

MASEPOHL B., KRANZ R.G. Regulation of nitrogen fixation. In *The Purple Phototrophic Bacteria* 23rd edn, pp. 759–775. Edited by Hunter C. N., Daldal F., Thurnauer M. C., Beatty J. T. **Dordrecht: Springer**; 10.1007/978-1-4020-8815-5\_38. (2009).

MELO, I.S. E AZEVEDO, J.L. (ed.). *Ecologia Microbiana*. **EMBRAPA - CNPMA**, Jaguariúna, 1998, p.445-486.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas : diversidade , ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 1, p.74-99, 2010.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**, The Hague, n. 1992, p. 205–215, 2002.

OLIVEIRA, P.P.A.; OLIVEIRA, W.S.; BARIONI JR., W. Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu inoculada com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio. São Carlos, SP: **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2007. 6p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, n.54).

PEDRINHO E.A.N.; JUNIOR R.F.G.; CAMPANHARO J.C.; ALVES L.M.C.; LEMOS E.G.M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia, Campinas**, v. 69, n. 4, p905-911, 2010

RAIJ, B. V. Avaliação da fertilidade do solo. Piracicaba: Instituto da Potassa & Fosfato: **Instituto Internacional da Potassa**, 1981. 142p

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, p. 541–554, 2004.

REIS JÚNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.103-113, 2004.

ROSADO, T. L.; GONTIJO, I. Adubação nitrogenada em pastagens: os resultados promissores obtidos na pesquisa e a realidade enfrentada pelos produtores. **VÉRTICES, Campos dos Goytacazes/RJ**, v.19, n.1, p. 163-174, 2017.

SILVA, A.A.O.; FELIPE, T.A.; BACH, E.E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, v.3, p.29-35, 2004a.

SOARES FILHO, C. V.; HEIRINCHS, R.; OLIVEIRA, F. C. DE; SILVA LIRA, M. V. Uso racional de adubação de pastagens. In: **SIMPÓSIO DE MANEJO SUSTENTÁVEL DAS**

**PASTAGENS DE RONDÔNIA**, 2, 2016, Porto Velho. Anais... Porto Velho, p. 102-142. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 888 p. 2017.

TIEN, T., GASKINS, M., HUBBELL, D., Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology** 37, 1016 e 1024. 1979.

VALÉRIO, J. R. Cigarrinhas-das-pastagens. Campo Grande: **Embrapa: Gado de Corte**, 51 p., (Embrapa-CNPGC. Documentos 179). 2009.

VALLE, C. B; MACEDO M. C. M.; EUCLIDES, V. P. B.; JANK. L. & RESENDE. L. M. S. Gênero *Brachiária*. In: FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa, MG: UFV, p.30-77. 2010.

Vasconcelos, C.N. 2006. Pastagens: implantação e manejo. Salvador, **EBDA**. 177p.

VILELA, H. Pastagem: seleção de plantas forrageiras, implantação e adubação. Viçosa, MG: **Aprenda Fácil**, 283p, 2005.

VINHAL-FREITAS, I. C., & Rodrigues, M. B. (2010). FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO. **Agropecuária Técnica**, 31(2), 143-154.

## II – OBJETIVO

### **Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da inoculação e da adubação nitrogenada sobre as características produtivas e fisiológicas na *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

### **Objetivos específicos**

Avaliar os efeitos da inoculação e da adubação sobre: produção, composição bromatológica, fracionamento de proteínas, teores de clorofila, fracionamento bioquímico de proteínas, açúcares solúveis e amido, características morfogênicas e área foliar.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Características gerais

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação pertencente ao setor de forragicultura e pastagens da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Itapetinga, entre julho e agosto de 2018.

48 vasos para cada experimento com capacidade de 12 kg de solo seco foram utilizados no experimento. O solo utilizado para preenchimento dos vasos foi coletado na camada de 0-20 cm de profundidade, no Campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga. O solo coletado foi destorroado e passado em peneira com malha de quatro mm, logo após realizou-se a coleta do material para análise de solo e preenchimento dos vasos. A análise de solo foi realizada no Departamento de Engenharia Agrícola e Solos, da UESB, cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Análise física e química da área experimental

Composição granulométrica (g/kg)			Classificação textural										
Areia	Silte	Argila	Franco arenoso										
830	70	100											
-----cmolc/dm <sup>3</sup> solo-----													
pH	mg/dm <sup>3</sup>	-											
H <sub>2</sub> O	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	S.B <sup>1</sup>	t <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>4</sup>	M <sup>5</sup>	M.O <sup>6</sup>
5,3	6	0,08	2,4	1,8	0,2	3,6	-	4,3	4,5	8,1	53	4	10

<sup>1</sup>Soma de bases. <sup>2</sup>CTC efetiva. <sup>3</sup>CTC pH 7. <sup>4</sup>Saturação de bases. <sup>5</sup>Saturação por Al<sup>3+</sup>. <sup>6</sup>Matéria orgânica  
Fonte: Departamento de Engenharia Agrícola e Solos da UESB.

As correções necessárias foram realizadas adotando-se o médio nível tecnológico, de acordo com as recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 5<sup>a</sup> aproximação (Alvarez & Ribeiro, 1999). As temperaturas máxima, mínima e média do período experimental foram 37,9°C, 17,2°C e 27,5°C para o experimento 1 e 37,2°C, 16,2°C e 26,7°C para o experimento 2 respectivamente.

### **3.1.2 Recomendação de calagem e adubação**

Com base na análise de solo e na exigência de saturação de base indicada por Alvarez & Ribeiro et al. (1999) para o *Brachiaria brizantha* cv. Marandu não houve necessidade de calagem.

Os níveis de fósforo encontrados pela análise de solo indicam baixa concentração aos exigidos pela planta segundo Alvarez & Ribeiro et al. (1999). Portanto, 50 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> foram aplicados na forma de super simples (18% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) equivalente a 288 kg de super simples por hectare. Não houve necessidade de adubação com potássio já que os níveis encontrados atendem as exigências pela planta.

### **3.1.3 Umidade do solo**

Para determinar a capacidade máxima de retenção de água, os vasos com solo seco foram pesados e, posteriormente encharcados com água durante três dias. Após o escoamento total do excedente de água, os vasos com solo úmido foram pesados e por diferença entre solo seco e úmido considerado como máxima capacidade de retenção de água pelo solo, sendo utilizado como base para reposição diária de água.

## **Experimento I**

Foi utilizado um esquema fatorial 2 X 4 em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições por tratamento, composto pela inoculação ou não de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* (Azb) nas sementes, através de um inoculante comercial contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com nível de garantia de  $2 \times 10^{11}$  UFC/L, e associação a 4 doses de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg de N por ha<sup>-1</sup> via ureia).

48 vasos preenchidos com 12 kg de solo seco foram alocados em casa de vegetação, no momento do plantio das sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu estes foram divididos em 2 grupos: o primeiro recebeu sementes inoculadas através da embebição destas no produto comercial na dose proporcional de 150 ml do inoculante para cada 10 kg de sementes. Estas ficaram embebidas durante dois minutos e logo em seguida foram plantadas. O segundo grupo foi composto por sementes que foram plantadas sem inoculação.

Após 15 dias do plantio, realizou-se um desbaste, mantendo-se quatro plantas por vaso, tendo como requisitos na escolha, o vigor e a homogeneidade das plantas. Ao alcançar

30 cm de altura foi realizado o corte de uniformização a 10 cm de altura e, logo em seguida, a adubação nitrogenada nas doses de 0, 40, 80 e 120 kg de N por ha<sup>-1</sup> via ureia de forma única. 30 dias após o corte de uniformização foi feito o corte e desmanche dos vasos.

## ***Experimento II***

Foi utilizado um esquema fatorial 2 X 4 em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições por tratamento, composto por duas formas de inoculação (via semente e pulverização) de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* (Azb), através de um inoculante comercial contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com nível de garantia de 2×10<sup>11</sup> UFC/L, e associação a 4 doses de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg de N por ha<sup>-1</sup> via ureia).

48 vasos preenchidos com 12 kg de solo seco foram alocados em casa de vegetação, no momento do plantio das sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu estes foram divididos em 2 grupos: o primeiro recebeu sementes inoculadas através da embebição destas no produto comercial na dose proporcional de 150 ml do inoculante para cada 10 kg de sementes. Estas ficaram embebidas durante dois minutos e logo em seguida foram plantadas. Após 15 dias do plantio, realizou-se um desbaste, mantendo-se quatro plantas por vaso, tendo como requisitos na escolha, o vigor e a homogeneidade das plantas. Quando as plantas alcançaram 30 cm de altura foi realizado o corte de uniformização a 10 cm de altura e logo em seguida a adubação nitrogenada nas doses de 0, 40, 80 e 120 kg de N por ha<sup>-1</sup> via ureia de forma única.

O segundo grupo recebeu inoculação via pulverização, o plantio foi realizado da mesma forma que o primeiro, porém sem o inoculante. Quando as plantas alcançaram 30 cm de altura foi realizado o corte de uniformização a 10 cm de altura e logo em seguida a adubação nitrogenada nas doses de 0, 40, 80 e 120 kg de N por ha<sup>-1</sup> via ureia de forma única. A aplicação do inoculante se deu 5 dias após o corte de uniformização, na dose de 600 ml/ha<sup>-1</sup>. 30 dias após o corte de uniformização foi feito o corte e desmanche dos vasos.

## **3.2 Avaliações**

### ***3.2.1 Características morfogênicas e estruturais***

Após o corte de uniformização foram marcados por vaso, dois perfilhos com fitas coloridas. Após intervalo de três dias foram realizadas as seguintes avaliações: aparecimento

do ápice foliar, comprimento e largura de folha, número de folhas, exposição completa de folha, comprimento de colmo e altura da planta. A partir dos dados coletados foram calculadas as seguintes características morfogênicas e estruturais: Taxa de alongamento de colmo (TAIC), taxa de alongamento foliar (TAIF), taxa de aparecimento foliar (TApF), Filocrono, comprimento final da folha (CFF) largura final de folha (LFF), altura do dossel (AD) e número total de folhas (NTF).

### **3.2.2 Produção de matéria seca**

Os vasos foram desmontados no final do período experimental utilizando água corrente, fez-se a retirada da planta inteira para determinação da produção vegetal, e posteriormente, a dessecação (raiz, colmo e folha), e assim, determinada a massa fresca (MF) e matéria seca (MS) dessas estruturas seguindo metodologia de Detmann (2012). Além de MF e MS, o volume de raiz foi determinado por diferença do conteúdo de água antes e pós-imersão, utilizando proveta graduada com quantidade de água conhecida.

### **3.2.3 Área foliar**

Ao final do período experimental as folhas provenientes de quatro plantas foram escaneadas para quantificar a área foliar, utilizando o programa computacional ImageJ. O programa determina a área da imagem ocupada pelas folhas pelo contraste com a área não ocupada. A partir daí foram calculados o índice de área foliar (IAF), área foliar específica (AFE,  $\text{dm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), razão área foliar ( $\text{dm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) e razão peso foliar (RPF).

### **3.2.4 índice SPAD, Clorofilas e carotenoides**

Ao final do período experimental foi utilizado o medidor portátil de clorofila SPAD 502 (Soil and Plant Analysis Development) para tomada de leituras de valor SPAD em três folhas de cada vaso (folhas mais representativas). O aparelho forneceu resultados imediatos da estimativa do teor de clorofila por meio de leituras realizadas no limbo foliar.

O medidor SPAD avalia, quantitativamente, a intensidade do verde da folha, medindo as transmissões de luz a 650 nm, onde ocorre absorção de luz pela molécula de clorofila, e a 940 nm, onde não ocorre absorção (Gil et al., 2002; Ferreira et al., 2006). Com estes dois

valores, o equipamento calcula um número ou índice SPAD que, normalmente, é altamente correlacionado com o teor de clorofila.

Também ao final do período experimental foi coletada a terceira folha completamente expandida de cada repetição às 10h00min da manhã. Realizou-se a fragmentação das mesmas e imediatamente foi preparado uma alíquota de 200 mg de massa fresca (Hiscox & Israelstam, 1979), que foi transferida para vidros de penicilina devidamente envolvidos com papel alumínio e identificados, contendo 5 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Após 72 horas foram realizadas leituras por espectrofotometria de absorção nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480nm, quantificando os pigmentos pelas equações de Wellburn (1994), sendo os valores ajustados para  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa fresca:

- clorofila  $a = 12,19 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649}$ ;

- clorofila  $b = 21,99 \cdot A_{649} - 5,32 \cdot A_{665}$  e;

- carotenoides =  $[1000 \cdot A_{480} - (2,14 \cdot \text{Clorofila } a) - 7(0,16 \cdot \text{Clorofila } b)] / 220$ , onde A = absorbância.

- razão clorofila  $a/b = \text{Clorofila } a / \text{Clorofila } b$

- clorofila total = (clorofila  $a$  + clorofila  $b$ ).

### 3.2.5 Açúcares solúveis totais (AST) e amido

Amostras de folha, colmo e raiz moídas em moinho de bola, foram utilizadas para quantificar os teores de açúcares solúveis totais (AST) e amido (colmo e raiz). A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada por meio de homogeneização de 300 mg de massa seca de colmo e raiz, em 12 mL de tampão  $\text{K}_2\text{PO}_4$  100 mM (pH 7,0), acrescida de 20 mM de ácido ascórbico. Após verificação prévia de não oxidação da massa seca, utilizou-se 4 ml de água destilada como extrator, seguido de centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos, foi coletado o sobrenadante, repetindo-se o processo por 2 vezes sendo combinado os sobrenadantes, com conteúdo final de 12 ml de extrato.

A extração do amido foi feita a partir do pellet oriundo da extração dos AST, o mesmo foi ressuscitado utilizando 5 ml do tampão de acetato de potássio 200 mM (pH 4,8), colocado em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida foi resfriado até atingir 50°C, posteriormente, adicionado solução enzimática contendo 11 unidades da enzima amiloglucosidase. A solução permaneceu em banho-maria a 50°C por duas horas em agitação. Posteriormente, realizou-se a centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado.



A quantificação dos açúcares solúveis totais e amido foi realizada pelo método da Antrona (Dische, 1962).

### **3.2.6 Análise bromatológica**

Após o corte (15 cm de altura), foram coletadas amostras de forragem para as análises em laboratório. As amostras foram identificadas, pesadas e colocadas em estufa com ventilação forçada a (55°C por 72h) para determinação da matéria pré-seca. Após a pré-secagem as amostras da parte aérea foram moídas em moinho tipo Willey em peneiras com crivos de 2 mm. Foram determinadas as análises de acordo com as metodologias descritas por Detmann et al. (2012). As análises dos teores de matéria seca (MS; Método INCT-CA G-003/1), proteína bruta (PB; 152 (nitrogênio total x 6,25) (Método INCT-CA N-001/1), fibra em detergente neutro (FDN) (Método INCT-CA F002/1), fibra em detergente ácido (FDA) (Método INCT-CA F-004/1), lignina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% p/p). Para a análise de FDN, as amostras foram corrigidas para o resíduo de cinzas (CIDN; 23 Método INCT-CA M-002/1) e compostos nitrogenados (NIDN; Método INCTCA N004/1).

A metodologia para determinar os carboidratos totais (CT) foi a de Sniffen et al. (1992), conforme a fórmula:  $CT = 100 - (PB + EE + MM)$ ; os carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela fórmula:  $CNF = 100 - (PB + FDN_{cp} + EE + MM)$ , no qual FDN<sub>cp</sub> corresponde ao FDN corrigido o seu conteúdo para cinzas e proteína.

### **3.2.7 Fracionamento de proteína**

Para o fracionamento de proteína os componentes foram obtidos através das metodologias descritas Licitra et al. (1996) e Fox et al. (2003), visando obter as seguintes frações: nitrogênio não proteico (A), proteína verdadeira de degradação enzimática rápida e intermediária (B1 + B2), proteína verdadeira que apresenta degradação enzimática lenta (B3) e proteína indigerível (C), compreendida pelo nitrogênio determinado no resíduo da fibra em detergente ácido (FDA) e multiplicado pelo fator de correção 6,25.

### **3.2.7 Fracionamento bioquímico de proteína**

Foram coletados 2 gramas de massa fresca de folhas e acondicionados em papel alumínio e congelados, para análise do fracionamento de proteínas. Para isso, 2 gramas de

massa fresca do material coletado foi macerado e homogenizado com 4 mL de água destilada, sendo considerado o primeiro extrator. O homogenato foi incubado a 35°C, por 30 minutos, sob agitação constante e em seguida, centrifugada a 1200 g, por 20 minutos, e coletado o sobrenadante.

A incubação foi realizada mais uma vez, sendo adicionado 3 ml de água destilada por processo, e os sobrenadantes coletados foram combinados e armazenados em freezer. Em seguida, cada amostra foi submetida à extração sequencial (frações) com os demais extratores: NaCl a 1%, etanol 80% e NaOH 100 mM, nesta ordem, seguindo os mesmos procedimentos realizados com a água. As proteínas solubilizadas em cada extrator foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), usando a solução de Coomassie blue G-250 e leitura em espectrofotômetro a 595 nm de absorbância. A quantidade de proteína em cada fração foi calculada por grama de massa seca (mg g de MS<sup>-1</sup>).

A classificação das proteínas foi feita de acordo com a definição de Osborne (1924), que classificou as proteínas de acordo com sua solubilidade. As proteínas do grupo das albuminas são aquelas solúveis em água destilada, as globulinas solúveis em soluções salinas (NaCl 1%), as prolaminas solúveis em etanol 80% e as glutelinas solúveis em soluções básicas (NaOH 100 mM).

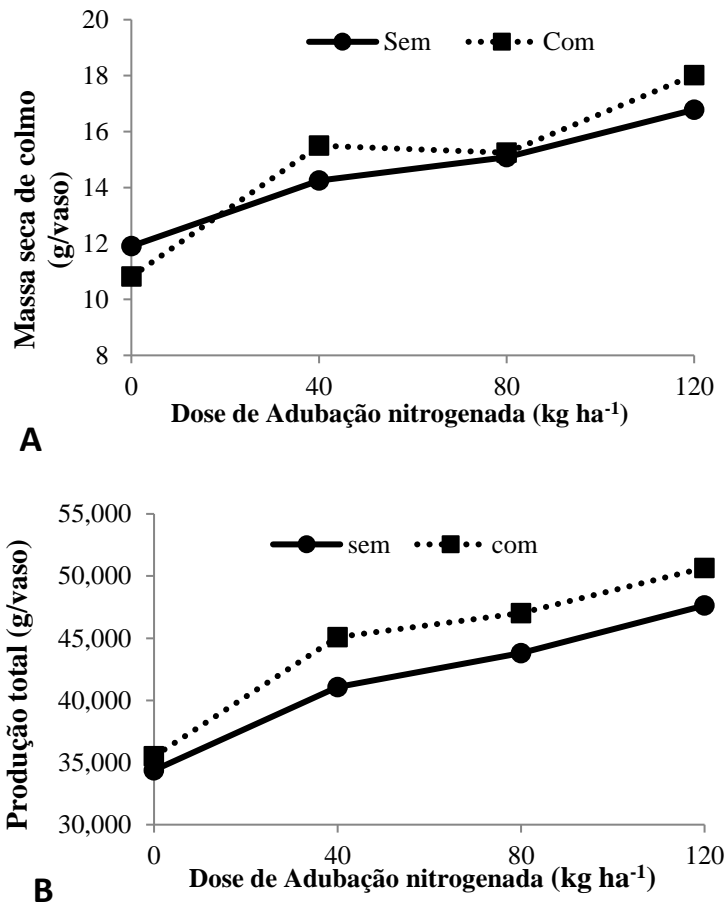
### **3.2.8 Estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa Statistical Analyzes System (Sas, 2004), considerando como fontes de variação do experimento I: doses de nitrogênio (N), inoculação (I) e a interação de N x I. Para o experimento II: doses de nitrogênio (N), formas de aplicação (A) e a interação de N x A. A interação foi desdobrada, ou não, de acordo com a significância, e os efeitos da fertilização com nitrogênio foram avaliados por análise de regressão simples, utilizando uma decomposição ortogonal do efeito do nitrogênio, cujos coeficientes foram avaliados pelo teste F ( $\alpha = 0,05$ ). A comparação entre a inoculação e suas formas de aplicação realizada pelo teste de F, adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

## IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento I

Houve efeito significativo de interação ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos com e sem *Azospirillum brasilense* (Azb) e doses de adubação nitrogenada (N) para as variáveis produção de massa seca de colmo e produção total de forragem (figura 3). Nas doses 40 e 120 kg de nitrogênio (N), a inoculação com Azb, promoveu aumentos de 8,7 e 7,3% na massa seca de colmo, respectivamente. E independente da dose, a inoculação com Azb promoveu aumento ( $P < 0,05$ ) na produção total (figura 3).



**Figura 3.** Massa seca de colmo (**A**) e produção total (g/vaso) (**B**) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado.

Equações de regressão: massa seca de colmo (<sup>sem</sup>) $y = 5,475x + 1724,7$   $R^2 = 0,97$ ; (<sup>com</sup>) $y = 7,5583x + 1654,8$   $R^2 = 0,85$ ; produção total (<sup>sem</sup>) $y = 15,032x + 5003,7$   $R^2 = 0,96$ ; (<sup>com</sup>) $y = 16,786x + 5301,7$   $R^2 = 0,89$

Tanto para massa seca de colmo quanto para produção total, o efeito foi linear crescente em relação às doses de N aplicadas (figura 3). Em relação à produção total, foi observado que no tratamento com Azb as produções foram maiores, independente da dose de nitrogênio utilizada. O aumento foi 3,17; 8,88; 6,87 e 5,99% para os tratamentos com Azb nas doses de 0; 40; 80 e 120 kg/ha de N respectivamente (figura 3).

Em relação aos efeitos encontrados com a utilização do Azb, além do efeito sobre a fixação biológica de nitrogênio, que segundo Franche et al. (2009) contribui com 7 a 10 kg de nitrogênio por ha<sup>-1</sup> mês<sup>-1</sup>, tem-se outro mecanismo que pode ter atuado nas plantas, a ação dos fitohormônios. Segundo Crozier et al. (1988), o principal hormônio produzido por Azb é a auxina (principalmente ácido indol-3-acético (IAA)). Porém, também produz citocininas (Cacciari et al., 1989) e giberelinas (Bottini et al., 1989). A interação entre auxina e citocinina promove crescimento e desenvolvimento da planta a partir da atuação sobre os meristemas, na formação de folhas e raízes (Azizi et al., 2015). Giberelinas produzidas nas folhas jovens em expansão desempenha papel primordial no estímulo da reação de auxina, afetando diretamente o alongamento do entrenó (Miller., 2011). Dessa forma, o aumento observado nas produções se deve a várias características do Azb, seja através da fixação biológica de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios.

O efeito positivo da adubação de N sobre o aumento da produção de parte aérea de forragens já foi constatado por outros estudos, Silva et al. (2013) encontraram aumento de até 249% na produção de folhas do *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, na dose de 300kg de nitrogênio/ha em relação a testemunha (0kg de nitrogênio/ha). Teixeira et al. (2018) trabalhando com 100kg de N ha<sup>-1</sup> e sem adubação de N encontraram aumento de até 32% na produção de matéria seca de folhas de *Brachiaria híbrida* cv. Mulato II.

O N é constituinte de muitos componentes celulares vegetais, incluindo aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos participando da formação do protoplasma e novas células, além de aumentar o alongamento celular (Doaa et al., 2015). Segundo Basra et al. (2014), o nitrogênio aumenta as taxas de crescimento e desenvolvimento da planta, principalmente por atuar nas taxas fotossintéticas.

A produção de folha foi 8,29% maior para o tratamento que recebeu aplicação de Azb, aumentando também a relação folha/colmo (tabela 2). O tratamento contendo o Azb levou a incremento em relação a todas as variáveis produtivas de parte aérea do *Brachiaria brizantha* cv. Marandu independente da dose de adubação de N utilizada.

A produção de massa seca de folha foi linear crescente em relação às doses de N aplicadas (tabela 2), com aumentos de 16, 22 e 26% para as doses 40, 80 e 120 kg de N/ha respectivamente.

Tabela 2 - Produção de Massa seca de folha (Folha) (g/vaso) e relação folha/colmo (F/C) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
Folha <sup>4</sup>	27,22b	29,68a	23,58	28,21	30,25	31,75	1,71	0,0001	0,0001	0,0720
F/C <sup>5</sup>	1,86b	2,07a	2,09	1,90	2,00	1,83	8,56	0,0018	0,0028	0,1559

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = 9,3919x + 3462,9 R<sup>2</sup> = 0,9299; <sup>5</sup>y = -0,0017x + 2,0566 R<sup>2</sup> = 0,5950

Para volume de raiz podemos observar que houve diferença significativa (P<0,05) em relação ao uso ou não do Azb, sendo que quando utilizado resultou em aumento (tabela 3). Já para a produção de massa seca de raiz não houve diferença significativa (P>0,05) (tabela 3). Em relação à adubação nitrogenada o resultado foi um crescimento linear tanto para volume de raiz (ml) quanto para massa seca de raiz (P<0,05) (tabela 3).

Em relação ao Azb, além da ação na fixação biológica de nitrogênio, observamos efeito característico da ação de fitohormônios, atuando na modificação estrutural das raízes levando a um aumento nas ramificações (Dobbelaere et al., 1999; Miyauchi, et al., 2008). Estas modificações implicaram no aumento da área de solo explorada através da maior produção de radículas, levando a um aumento no volume das raízes sem, no entanto, acarretar aumento do seu peso. Segundo Krikorian. (1991), o principal efeito das auxinas é a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento. Além de serem os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (Taiz & Zeiger., 2017). Dentre as vantagens de se ter uma maior área de solo explorada pelas raízes, podemos citar o aumento na absorção de água e sais minerais e a tolerância a estresses, o que resulta em plantas saudáveis e mais produtivas.

Como podemos observar, ocorreram maiores produções de massa seca para todas as estruturas avaliadas, (folha (tabela 2), colmo (figura 3) e raiz (tabela 3)), que receberam a adubação nitrogenada, justificando a relação desse nutriente e sua maior eficiência na atuação dos processos fotossintéticos quando absorvido via raiz. A atuação do N via solo promoveu

maior fixação de carbono e formação de estruturas, permitindo que a planta forneça maior crescimento e armazenamento de seus fotoassimilados na forma de raiz.

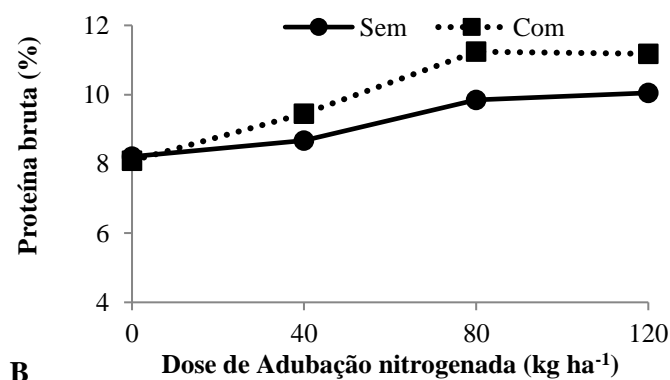
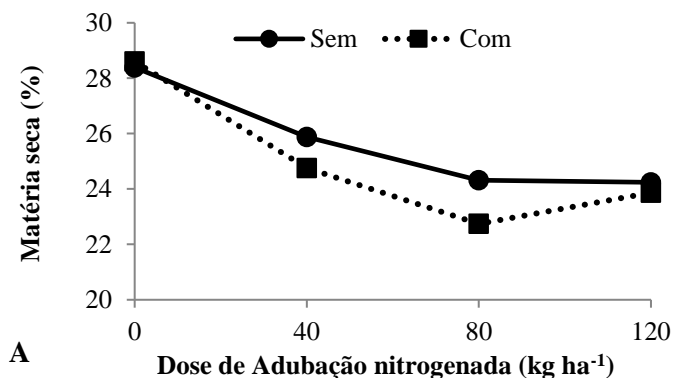
Tabela 3 – Volume de raiz (Vol. Raiz) (ml) e massa seca de raiz (MS raiz) (g/vaso) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

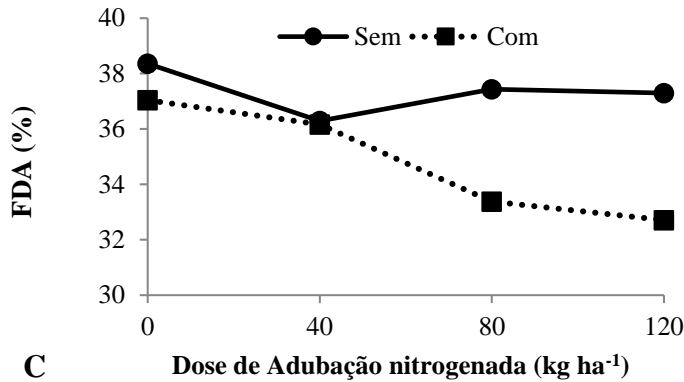
tem	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
Vol. Raiz <sup>4</sup>	238,8b	278,9a	200,0	253,8	286,7	295,0	10,81	0,0006	0,0001	0,2276
MS raiz <sup>5</sup>	59,3	60,3	39,7	63,01	63,5	70,9	5,62	0,5562	0,0001	0,5104

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = 0,7948x + 211,17 R<sup>2</sup> = 0,9073; <sup>5</sup>y = 0,235x + 45,189 R<sup>2</sup> = 0,8049

A interação entre o uso do Azb e doses de adubações nitrogenadas foi significativa (P<0,05) para as variáveis matéria seca (MS) proteína bruta (PB) e fibra em detergente ácido (FDA) (figura 4). Houve redução nos teores de MS com a utilização do Azb nos níveis de 40 e 80 kg de N ha<sup>-1</sup>, sendo o menor teor de MS observado com o uso de 80 kg N ha<sup>-1</sup>. Os teores de PB aumentaram com o uso do Azb a partir da dose de 40 kg de N ha<sup>-1</sup>, o maior valor de PB foi observado na dose de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N, associado ao uso do inoculante contendo Azb. Sendo este 12,37% maior em comparação apenas a utilização da adubação nitrogenada.





**Figura 4.** Matéria seca (MS) (A), proteína bruta (PB) (B) e fibra em detergente ácido (FDA) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado.

Equações de regressão: MS <sup>(sem)</sup>y = -0,035x + 27,809 R<sup>2</sup> = 0,87; <sup>(com)</sup>y = 0,0008x<sup>2</sup> - 0,1337x + 28,667 R<sup>2</sup> = 0,99; PB <sup>(sem)</sup>y = 0,0168x + 8,19 R<sup>2</sup> = 0,93; <sup>(com)</sup>y = 0,0277x + 8,331 R<sup>2</sup> = 0,89; FDA <sup>(sem)</sup>y = 0,0003x<sup>2</sup> - 0,0413x + 38,135 R<sup>2</sup> = 0,53; <sup>(com)</sup>y = -0,0394x + 37,188 R<sup>2</sup> = 0,94

Houve significância (P<0,05) para o uso do Azb nas concentrações de FDN<sub>CP</sub>, assim como para doses de adubação de N que proporcionaram efeito linear negativo nos teores de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN<sub>CP</sub>) e carboidratos totais (CT) (tabela 4). Verificou-se então, que a adubação nitrogenada favoreceu a redução da FDN<sub>CP</sub>, assim como o uso do Azb, fato que pode estar ligada a maior produção de folhas, onde há uma maior participação de constituintes solúveis e proteína bruta e menor de tecidos de sustentação. Paciullo et al. (2017) justifica essa diminuição do FDN<sub>CP</sub> a paredes celulares mais finas do esclerênquima, causado pelo maior sombreamento devido à alta produção de massa. As plantas com menores teores de FDN<sub>CP</sub> foram às mesmas com maior produção de matéria seca de folha (tabela 2) e índice de área foliar (figura 6). Abraham et al. (2014) ainda justificam que o aumento da concentração de folhas proporciona redução dos teores de fibra por se tratar de tecidos menos lignificados quando comparado com colmo.

Não houve diferença significativa (P>0,05) para uso do Azb nem para adubação de N em relação aos carboidratos não fibrosos, porém, a diminuição nos teores de fibra acarretou na consequente diminuição dos teores de CT (tabela 4).

Tabela 4 – Composição bromatológica de *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
MM	2,29	2,20	2,23	2,22	2,23	2,30	6,28	0,1028	0,6115	0,0488
EE	2,33	2,49	2,08	2,52	2,37	2,68	25,4	0,4597	0,2713	0,8072
FDN <sub>CP</sub> <sup>4</sup>	65,96a	65,27b	68,44	65,78	65,31	62,91	1,31	0,0332	0,0001	0,2873
LIGNINA	3,93	3,96	4,02	3,73	4,38	3,65	15,9	0,8786	0,1169	0,0873
CNF	20,06	19,34	19,43	19,86	19,15	20,37	7,42	0,1772	0,3876	0,9263
CT <sup>5</sup>	85,89	85,51	87,79	86,33	84,73	83,95	0,70	0,0892	0,0001	0,0856

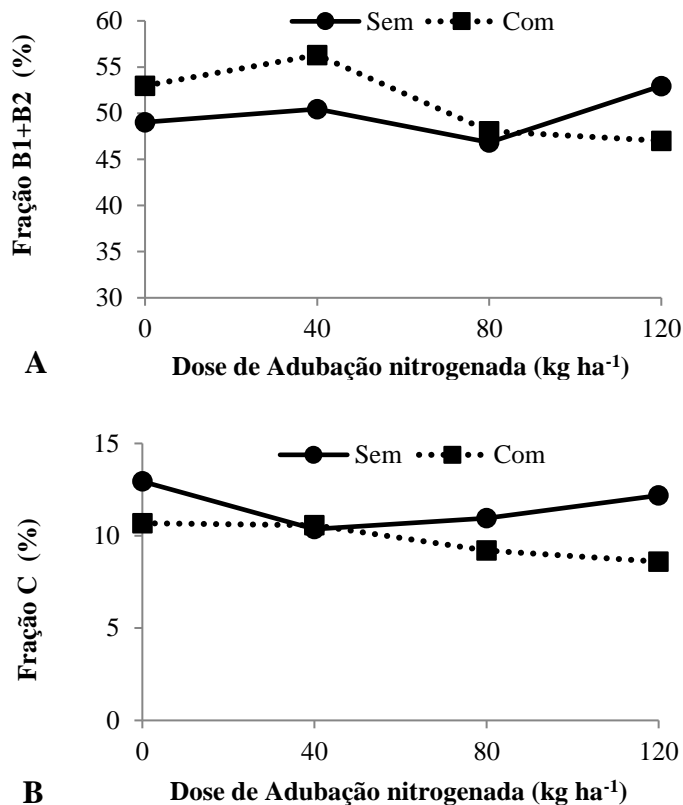
Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) Matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN<sub>CP</sub>), carboidratos não fibroso (CNF) e carboidratos totais (CT). CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = -0,0427x + 68,17 R<sup>2</sup> = 0,9439; <sup>5</sup>y = -0,0327x + 87,664 R<sup>2</sup> = 0,9815

A interação entre o uso do Azb e doses de adubações de N, foi significativa (P<0,05) para as frações B1+B2 e C das proteínas (figura 5). As frações B1+B2 foram as que tiveram maiores teores em comparação as outras frações. Podemos observar valores superiores para o tratamento que foi inoculado com Azb, ocorrendo o contrário apenas na dose de 120 kg de N ha<sup>-1</sup>). Dessa forma, para o tratamento que foi inoculado com Azb houve maior aporte de nitrogênio associado com a adubação de N, que foi convertido à proteína verdadeira, com maior concentração de organelas, principalmente cloroplastos, porém, essa conversão não foi contínua com o aumento do fornecimento de N, tendo melhor resultado na dose de 40 kg de N ha<sup>-1</sup>. Em relação à adubação nitrogenada houve efeito quadrático para ambos os tratamentos, entretanto, quando foi utilizado o inoculante tivemos aumento e depois uma queda nos valores à medida que se aumentou a dose de nitrogênio. A fração B1+B2 é formada por proteínas citoplasmáticas, que são classificadas como proteínas verdadeiras de rápida e intermediária degradação no rúmen (Sniffen et al., 1992).

A fração C que é a fração não degradado no rumen, Sniffen et al. (1992), foi à que apresentou os menores teores, quando inoculado com Azb, a resposta foi linear decrescente, refletido pelo aumento da fração A.





**Figura 5.** Fração B1 + B2 (A) e fração C (B) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado.

Equações de regressão: fração B1 + B2 <sup>(sem)</sup> $y = 1,1775x^2 - 5,0745x + 53,677$   $R^2 = 0,45$ ; <sup>(com)</sup> $y = -0,0007x^2 + 0,0169x + 53,918$   $R^2 = 0,69$ ; fração C <sup>(sem)</sup> $y = 0,0006x^2 - 0,0754x + 12,812$   $R^2 = 0,92$ ; <sup>(com)</sup> $y = -0,019x + 10,904$   $R^2 = 0,9158$

O uso do Azb levou a um aumento de 6,66 e 13,56% para fração A e B3 respectivamente (tabela 5). Já em relação à adubação de N as respostas foram quadráticas, sendo que a adubação aumentou o teor da fração A, assim como o uso do Azb (tabela 5). Essa resposta é consequência do maior aporte de N e maior assimilação pela planta, dessa forma levou a uma proporção maior do nitrato na folha, que é uma porção da fração A. Segundo Taiz & Zeiger. (2017), à medida que o suprimento de nitrato aumenta, uma proporção maior do nitrato absorvido é translocado para as partes aéreas, sendo posteriormente reduzido a nitrito no citosol.

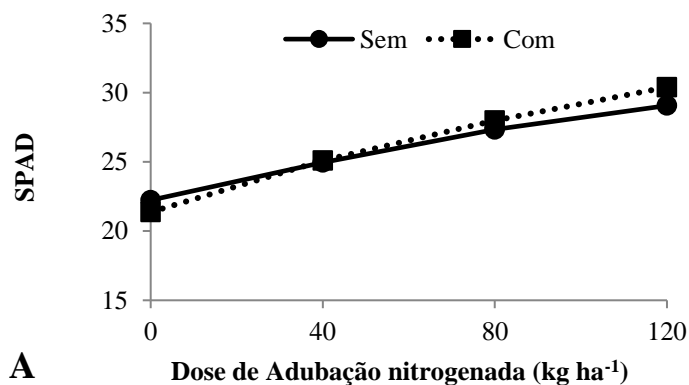
Tabela 5 – Fração B3 da proteína de *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

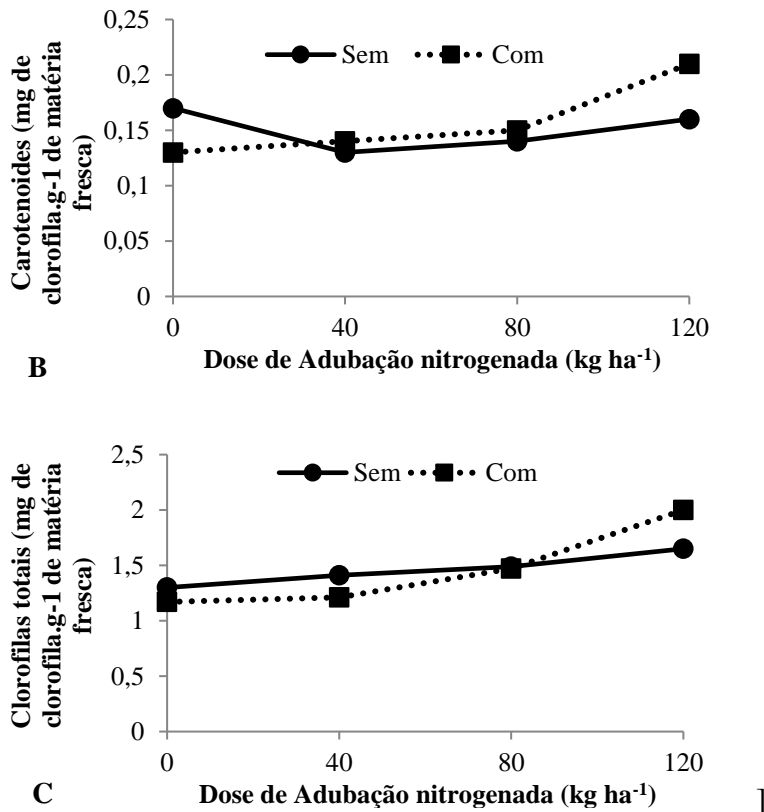
Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
Fração A <sup>4</sup>	23,96b	25,67a	22,74	23,67	27,35	25,51	5,89	0,0034	0,0001	0,0670
Fração B3 <sup>5</sup>	13,07b	15,12a	14,44	12,48	15,87	13,61	12,81	0,0043	0,0091	0,1211

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação<sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = -0,0004x<sup>2</sup> + 0,0819x + 22,327 R<sup>2</sup> = 0,727; <sup>5</sup>y = -5E-05x<sup>2</sup> + 0,0079x + 13,89 R<sup>2</sup> = 0,0103

A interação entre o uso do Azb e doses de adubações de N, foi significativa (P<0,05) para as variáveis índice SPAD, carotenoides e clorofilas totais (figura 6). Efeito observado apenas na dose utilizada de 120 kg/ha de N, onde o uso do Azb acarretou em maiores teores. Em relação à adubação nitrogenada, observamos que os valores do índice SPAD e clorofilas totais cresceram linearmente com o uso da adubação. Segundo Marenco & Lopes. (2005), 70% do nitrogênio contido nas folhas estão nos cloroplastos, participando da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila. O N participa como constituinte de muitas moléculas que participam da síntese de novos tecidos, inclusive as clorofilas, dessa forma maiores doses de N estimulam a síntese de pigmentos fotossintéticos (Martuscello et al., 2016), A maior produção de clorofilas a, favorece a síntese de ATP (adenosina trifosfato) nos cloroplastos, esse pigmento possibilita a maior percepção de luz, que é utilizada no processo de fotofosforilação (Taiz & Zeiger, 2017). Estimulando a maior atividade fotossintética, devido a maior capacidade de captação de luz pelos pigmentos fotossintéticos.





**Figura 6.** Valores de SPAD (A), teores de carotenoides (mg de clorofila.g-1 de matéria fresca) (B) e clorofilas totais (mg de clorofila.g-1 de matéria fresca) (C) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado.

Equações de regressão: SPAD <sup>(sem)</sup>y = 0,0572x + 22,467 R<sup>2</sup> = 0,99; <sup>(com)</sup>y = 0,0749x + 21,715 R<sup>2</sup> = 0,99; Carotenoides <sup>(sem)</sup>y = 9E-06x<sup>2</sup> - 0,0012x + 0,168 R<sup>2</sup> = 0,92; <sup>(com)</sup>y = 8E-06x<sup>2</sup> - 0,0003x + 0,1325 R<sup>2</sup> = 0,97; clorofilas totais <sup>(sem)</sup>y = 0,0028x + 1,293 R<sup>2</sup> = 0,98 ; <sup>(com)</sup>y = 0,0069x + 1,05 R<sup>2</sup> = 0,86

Não houve significância (P>0,05) para o uso do Azb em relação à clorofila a, b e razão entre clorofila a/b. Houve diferença significativa para clorofila a e razão a/b em relação às doses de N, apresentando efeito linear crescente (P>0,05) (tabela 6). O teor de clorofila b foi menor que a clorofila a. Silva et al., (2001) afirmaram que o teor de clorofila por cloroplasto é menor em plantas com fisiologia C4, principalmente a clorofila b, pois, assim, não há necessidade de gasto energético para produção de pigmentos coletores de radiação, já que se desenvolvem bem em ambientes saturados de luz.

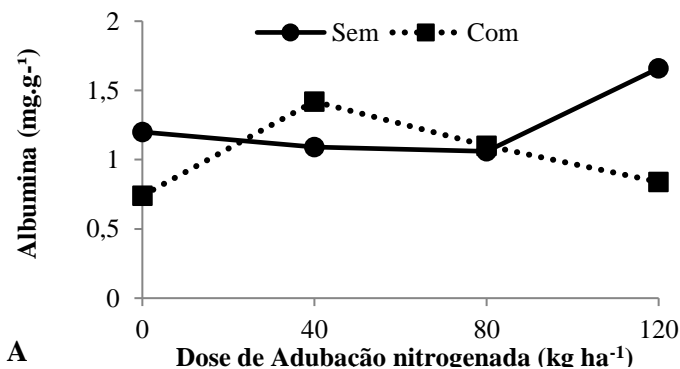
Tabela 6 – Teores de clorofila *a* (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca), clorofila *b* (mg de clorofila.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) e razão *a/b* de *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
Clorofila <i>a</i> <sup>4</sup>	0,98	0,98	0,83	0,91	1,01	1,18	26,58	0,5728	0,0278	0,2013
Clorofila <i>b</i>	0,51	0,49	0,45	0,46	0,53	0,56	27,91	0,8691	0,0918	0,1642
Razão <i>a/b</i> <sup>5</sup>	1,92	2,00	1,84	1,98	1,91	2,11	15,83	0,1684	0,0053	0,6625

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = 0,0029x + 0,81 R<sup>2</sup> = 0,9685; <sup>5</sup>y = 0,0019x + 1,849 R<sup>2</sup> = 0,6879

A interação entre o Azb e doses de adubações de N, foi significativa (P<0,05) para os teores de albumina. Sem o uso da adubação nitrogenada foi observado maior valor para o tratamento sem o Azb o mesmo efeito foi encontrado para a dose de 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, esse efeito se inverteu para a dose de 40 kg de N ha<sup>-1</sup> (figura 7). Em relação à adubação de N houve efeito quadrático positivo sem o uso do Azb e negativo com o uso. As albuminas compreendem a maioria das enzimas em vegetais devido a sua capacidade de solubilização em água, atua aumentando a formação de clorofilas e, conseqüentemente, de enzimas que atuam nos processos fotossintéticos como à Rubisco (Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) e a PEP-carboxilase (Fosfoenolpiruvato carboxilase) (Cabrera-Bosquet et al., 2009).



**Figura 7.** Teor de Albumina (mg.g<sup>-1</sup>) (A) em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado.

Equações de regressão: albumina<sup>(sem)</sup>y = 0,0001x<sup>2</sup> - 0,0099x + 1,2275 R<sup>2</sup> = 0,93; albumina<sup>(com)</sup>y = -0,0001x<sup>2</sup> + 0,0176x + 0,793 R<sup>2</sup> = 0,80

Houve efeito significativo em relação ao uso do Azb para os teores de globulina (P<0,05), onde com o uso houve acréscimo de 20% (tabela 7). As globulinas têm papel direto

na melhoria da eficiência metabólica da planta, pois atuam tanto na melhoria da eficiência fotossintética como na absorção e transporte de nutrientes pelas raízes, além de constituírem como uma grande reserva de nitrogênio prontamente sintetizado durante o período de rebrota (Volenc et al., 1996; Avice et al., 2003). O N levou a efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) para globulina e glutelina, além de linear para prolamina (tabela 7).

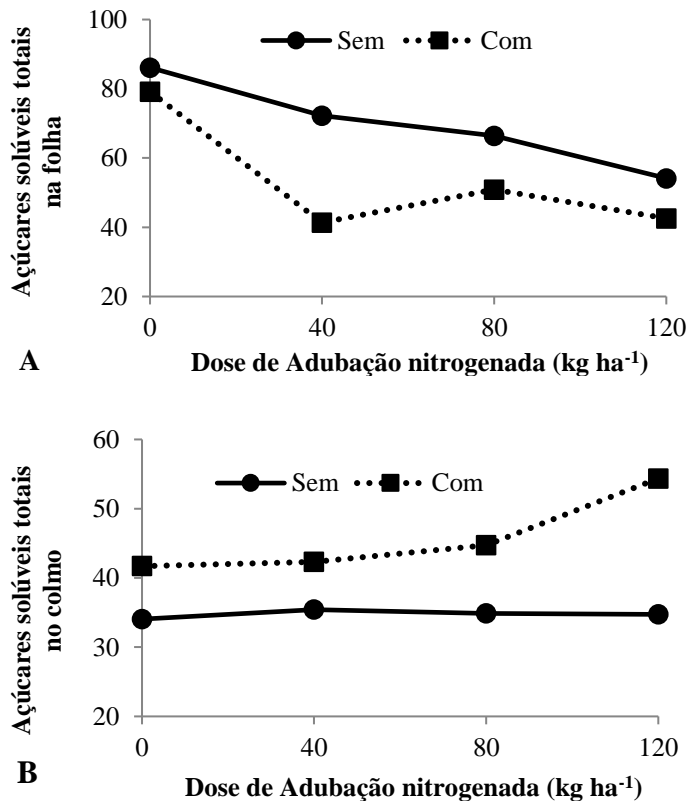
Tabela 7 – Teores de globulina, prolamina e glutelina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) em *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
Globulina <sup>4</sup>	0,34b	0,43a	0,42	0,34	0,32	0,44	12,17	0,0001	0,0001	0,1368
Prolamina <sup>5</sup>	0,18	0,15	0,12	0,15	0,20	0,20	22,43	0,0659	0,0006	0,1944
Glutelina <sup>6</sup>	0,51	0,54	0,58	0,52	0,41	0,58	21,86	0,4746	0,0272	0,5021

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup> $y = 3\text{E-}05x^2 - 0,0037x + 0,4254$   $R^2 = 0,97$ ; <sup>5</sup> $y = 0,0007x + 0,1244$   $R^2 = 0,8655$ ; <sup>6</sup> $y = 4\text{E-}05x^2 - 0,0045x + 0,5921$   $R^2 = 0,7254$

A interação entre o uso do Azb e doses de adubações de N, foi significativa ( $P < 0,05$ ) para as variáveis açúcares solúveis totais (AST) na folha e no colmo, onde podemos observar maiores teores de AST na folha onde não houve aplicação do Azb. Houve uma diminuição em relação às doses crescentes de N. Segundo Cecato et al., (2004), o N eleva a concentração de proteínas nas plantas, dessa forma, sendo as proteínas sintetizadas a partir de carboidratos, o aumento do fornecimento do nitrogênio reduz os teores de carboidratos solúveis. Ainda segundo Cecato et al., (2004), qualquer incremento em componentes nitrogenados requer diminuição compensatória em componentes não nitrogenados, especialmente carboidratos solúveis. Pois carboidratos produzidos por meio da fotossíntese são logo utilizados para produção de novos tecidos, e ou translocados para outras partes da planta, podemos confirmar esse efeito ao observamos aumento dos carboidratos solúveis no colmo e raiz em relação à adubação nitrogenada. Em relação ao uso do Azb, este fornece nitrogênio fixado diretamente para a planta hospedeira em troca de outros nutrientes e de carboidratos (Taiz & Zeiger, 2017). Consequentemente, essas bactérias necessitaram de mais carboidratos para seu crescimento e multiplicação, consumindo maiores proporções de açúcares solúveis.



**Figura 8.** Açúcares solúveis totais (AST) na folha (**A**) e no colmo (**B**) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado. Equações de regressão: AST folha <sup>(sem)</sup> $y = -0,2544x + 84,998$   $R^2 = 0,98$ ; <sup>(com)</sup> $y = 0,0046x^2 - 0,8033x + 75,897$   $R^2 = 0,77$ ; AST colmo <sup>(sem)</sup> $y = 0,0044x^2 - 0,4052x + 36,666$   $R^2 = 0,71$ ; <sup>(com)</sup> $y = 0,0004x^2 - 0,1016x + 42,712$   $R^2 = 0,54$

Para o AST no colmo observa-se que na dose de 80 e 120 kg de N ha<sup>-1</sup> houve aumento significativo no teor ( $P < 0,05$ ) entre o uso ou não do Azb (figura 8).

O uso do Azb aumentou a AST da raiz em 12,09%. Já em relação à adubação de N o aumento foi de 35,22 % na maior dose. Consequência de um maior crescimento vegetal e aumento de área foliar, levando a uma maior produção de fotoassimilados (Tabela 8).

A adubação nitrogenada levou a um aumento do Am do colmo e raiz ( $P > 0,05$ ) (Tabela 8). Segundo Lemaire e Chapman. (1996), o excesso de assimilados pode ser armazenado em órgãos de reserva. Dessa forma, com o aumento de fotoassimilados devido ao aumento da disponibilidade de N, os assimilados foram translocados para órgãos de reserva.

Tabela 8 – Açúcares solúveis totais (AST) em raiz, amido (Am) no colmo e amido na raiz em *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
AST raiz <sup>4</sup>	23,78b	27,05a	18,61	28,43	25,90	28,73	13,31	0,0126	0,0001	0,4970
Am colmo <sup>5</sup>	9,17	8,98	5,97	6,98	11,56	11,79	13,29	0,6657	0,0001	0,4499
Am raiz <sup>6</sup>	7,80	7,90	6,23	7,92	8,41	8,92	8,52	0,5441	0,0001	0,9672

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05), CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = -0,0011x<sup>2</sup> + 0,2006x + 19,496 R<sup>2</sup> = 0,7646; <sup>5</sup>y = 0,0551x + 5,769 R<sup>2</sup> = 0,8808; <sup>6</sup>y = 0,0214x + 6,586 R<sup>2</sup> = 0,8966

O uso do Azb acarretou em aumento significativo (P<0,05) para o número total de folhas (NTF) (Tabela 9) onde este último foi de 12,51%, o número total de folhas é uma variável importante, pois influencia diretamente a produção de matéria seca. Foi exatamente o que aconteceu neste experimento, onde o aumento na produção de matéria seca de folha foi 8,29% maior para o tratamento que recebeu aplicação de Azb (tabela 2). Houve também uma menor taxa de alongamento de colmo (TAIC) com o uso do Azb o que está em concordância com a maior relação folha/colmo encontrada (tabela 2).

Tabela 9 - Taxa de alongamento de colmo (TAIC), taxa de alongamento foliar (TAIF), taxa de aparecimento foliar (TApF), Filocrono, comprimento final da folha (CFF) largura final de folha (LFF), altura do dossel (AD) e número total de folhas (NTF) em *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
TAIC <sup>4</sup>	0,53a	0,45b	0,41	0,46	0,52	0,57	5,310	0,0003	0,0270	0,0510
TAIF <sup>5</sup>	4,86	4,45	3,45	4,76	5,12	5,28	23,57	0,0716	0,0360	0,0473
TApF <sup>6</sup>	0,12	0,13	0,09	0,12	0,14	0,15	14,38	0,0988	0,0001	0,8306
Filocrono <sup>7</sup>	8,64	8,75	11,91	8,21	7,69	6,97	15,67	0,7887	0,0002	0,1362
CFF <sup>8</sup>	48,85	46,27	44,34	48,96	48,56	50,39	12,72	0,7715	0,0001	0,2216
LFF <sup>9</sup>	1,97	1,91	1,71	1,94	2,03	2,07	8,40	0,2060	0,0394	0,2396
AD <sup>10</sup>	48,56	50,62	42,38	47,50	54,12	54,37	6,76	0,2240	0,0001	0,2988
NTF <sup>11</sup>	22,17b	25,34a	20,63	22,63	26,22	25,56	5,98	0,0001	0,0001	0,3131

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05), CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

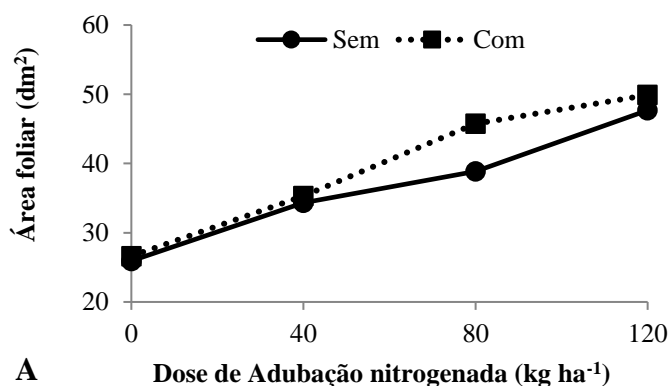
<sup>4</sup>y = 0,0013x + 0,409 R<sup>2</sup> = 0,9986; <sup>5</sup>y = 0,0146x + 3,775 R<sup>2</sup> = 0,8267; <sup>6</sup>y = 0,0005x + 0,095 R<sup>2</sup> = 0,9524; <sup>7</sup>y = 0,0005x<sup>2</sup> - 0,0942x + 11,741 R<sup>2</sup> = 0,9608; <sup>8</sup>y = -0,0004x<sup>2</sup> + 0,0967x + 44,703 R<sup>2</sup> = 0,8707; <sup>9</sup>y = 0,0029x + 1,762 R<sup>2</sup> = 0,8789; <sup>10</sup>y = -0,0008x<sup>2</sup> + 0,1978x + 41,987 R<sup>2</sup> = 0,9689; <sup>11</sup>y = -0,0004x<sup>2</sup> + 0,0958x + 20,338 R<sup>2</sup> = 0,9163

Houve significância para o efeito da adubação N em todas as características estruturais avaliadas (P<0,05). De acordo a adubação houve aumento para taxa de alongamento de colmo (TAIC) e taxa de alongamento foliar (TAIF), o que refletiu no aumento da altura do dossel

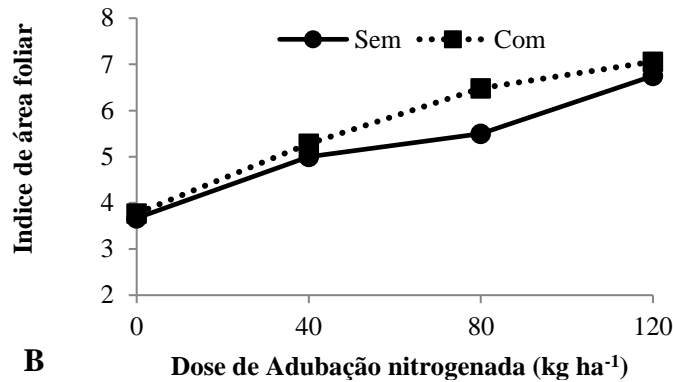
(AD). Também houve efeito ( $P>0,05$ ) para taxa de aparecimento foliar (TApF), comprimento final da folha (CFF), largura final de folha (LFF) e número total de folhas (NTF) (Tabela 9). Tais resultados evidenciam que o N estimula a produção de novas células, o que possibilita aumento significativo nas características morfológicas das plantas. Quando as plantas são adubadas com N em momento de condições ideais de luminosidade, umidade e temperatura são então submetidas às condições favoráveis de crescimento, favorecendo a divisão celular, o que acaba promovendo a intensificação do crescimento vegetativo e acarretando em um maior alongamento das plantas (Lopes et al., 2011; Garcez Neto et al. 2002; Vitor et al., 2009). Destarte, justificando os resultados obtidos para todas as características morfológicas neste trabalho, assim como a maior produção total de matéria seca (figura 3).

Houve uma diminuição para Filocrono, ou seja, o intervalo de tempo para aparecimento de duas folhas sucessivas, que se correlaciona negativamente com o desenvolvimento de folhas e altura do dossel (AD).

Avaliando o efeito da interação para área foliar (AF) ( $\text{dm}^2$ ), índice de área foliar (IAF) e área foliar específica (AFE) ( $\text{dm}^2 \text{g}^{-1}$ ) observa-se que para as doses de 80 e 120  $\text{kg de N ha}^{-1}$  houve uma maior AF quando inoculado com Azb. Sendo que o mesmo ocorreu com o IAF ( $P<0,05$ ) (figura 9). Houve aumento linear para área foliar em relação à adubação N independente do uso ou não do inoculante contendo Azb ( $P<0,05$ ).







**Figura 9.** Área foliar (AF) (dm<sup>2</sup>) (A) e índice de área foliar (IAF) (B) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado.

Equações de regressão: área foliar <sup>(sem)</sup>y = 0,1719x + 26,635 R<sup>2</sup> = 0,97; <sup>(com)</sup>y = 0,2032x + 26,957 R<sup>2</sup> = 0,97; índice de área foliar <sup>(sem)</sup>y = 0,0244x + 3,769 R<sup>2</sup> = 0,97; <sup>(com)</sup>y = 0,0277x + 3,987 R<sup>2</sup> = 0,97

A interação entre o uso do Azb e adubação de N não foi significativa (P>0,05), para as variáveis razões área foliar (RAF) e razão peso foliar (RPF). Como também não houve diferença significativa em relação às variáveis independentes em relação à RAF. O RPF foi superior quando se utilizou a inoculação com Azb ocorrendo efeito quadrático em relação à adubação nitrogenada (tabela 10).

Tabela 10 – Razão área foliar (RAF) (dm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) e razão peso foliar (RPF) de *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu em função da aplicação de *Azospirillum brasilense* e fertilizante nitrogenado

Item	<i>Azospirillum</i>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	Sem	Com	0	40	80	120		A <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	AxS <sup>3</sup>
RAF	0,31	0,32	0,32	0,30	0,32	0,32	6,80	0,0958	0,2799	0,0950
RPF <sup>4</sup>	0,62b	0,67a	0,64	0,66	0,68	0,62	5,31	0,0003	0,0265	0,0510

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação; <sup>1</sup>*Azospirillum*; <sup>2</sup>Nitrogênio; <sup>3</sup>Efeito de interação entre *Azospirillum* e Nitrogênio.

<sup>4</sup>y = -1E-05x<sup>2</sup> + 0,0014x + 0,636 R<sup>2</sup> = 0,8400

## Experimento II

A interação foi significativa ( $P < 0,05$ ) para produção de massa seca de folha, caule, produção total e relação folha/colmo em função da forma de aplicação do inoculante contendo a bactéria *Azospirillum brasilense* (Azb) e uso da adubação nitrogenada (figura 10).

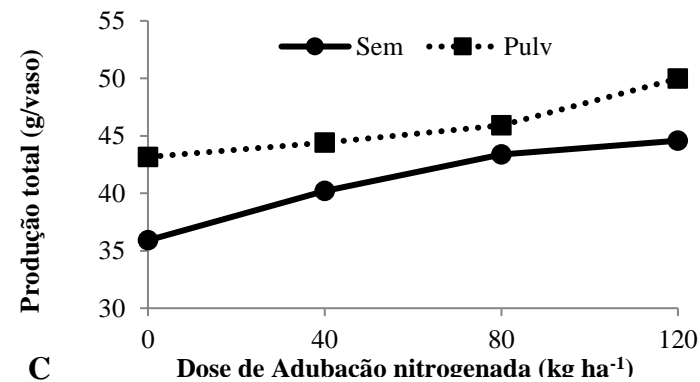
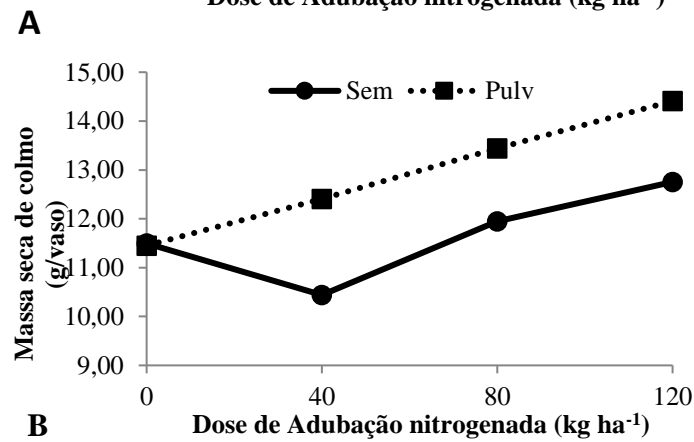
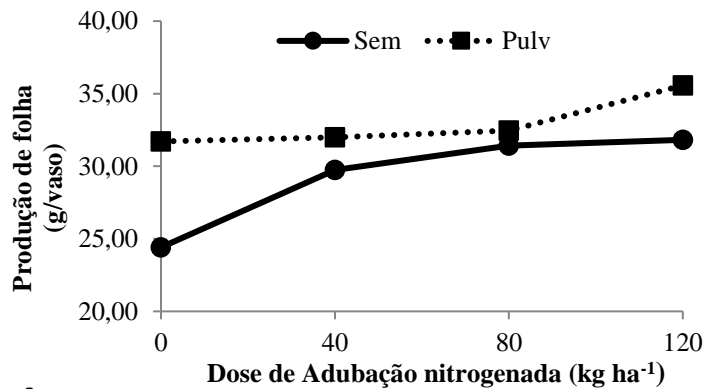
Verificou-se que a produção de folha foi maior quando o Azb foi aplicado via pulverização nas doses de 0, 40 e 120 kg de nitrogênio (N)  $\text{ha}^{-1}$ , não diferenciando estatisticamente na dose de 80 kg de  $\text{ha}^{-1}$  ( $P > 0,05$ ). Para produção de caule, foi observada diferença significativa entre as formas de aplicação do Azb a partir da dose de 40 kg de  $\text{ha}^{-1}$ , sendo a produção de caule maior na dose de 120 kg de  $\text{ha}^{-1}$ , assim como ocorreu para produção de folha (figura 10).

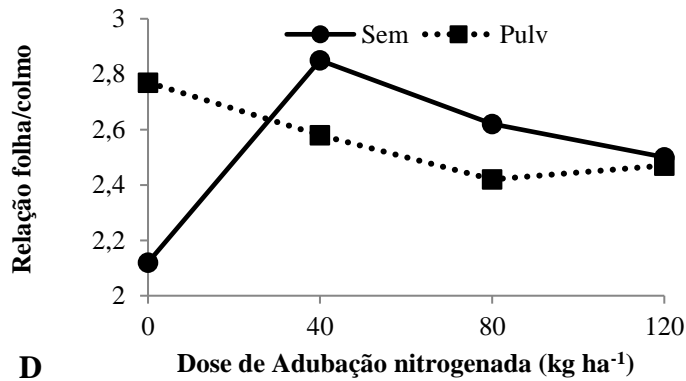
Em relação à produção total da planta (folha + colmo), observa-se maior produção ( $P < 0,05$ ) quando o Azb foi aplicado de forma pulverizada independente da dose de nitrogênio aplicada (figura 10). Em estudo com milho (*Zea mays*), onde foi testada a inoculação de Azb via semente e pulverização, além de aplicação foliar de metabólitos (fitohormônios) extraídos do cultivo do Azb, Fukami et al. (2017) observou benefícios para o crescimento das plantas tanto na aplicação via sementes quanto para aplicação foliar, mas, também houve efeito na aplicação de metabólitos. Então, investigou-se a colonização bacteriana de folhas por microscopia e foi observado que após 48h, as células não foram detectadas por microscopia. Os autores então sugerem que os benefícios observados da pulverização foliar de células de Azb resultaram de metabólitos (fitohormônios), principalmente ácido indol-3-acético (AIA) presentes no inoculante, ao invés de células vivas.

Como a aplicação pulverizada além de atingir as folhas também atingiram o solo, neste trabalho, podemos inferir que houve efeito dos fitohormônios tanto nas folhas como no solo, via raízes. Além da colonização bacteriana do solo, promovendo a fixação biológica de nitrogênio e produção de metabólitos.

Outro ponto a ser considerado é a redução do nitrato que ocorre no citosol e envolve a ação da nitrato redutase produzindo nitrito, entrando nos plastídios das raízes ou cloroplastos das folhas onde é reduzido a amônia pela ação da enzima nitrito redutase (Donato et al., 2004). O nitrato redutase é uma das enzimas mais sensíveis a qualquer estresse nas plantas, pois é altamente dependente do NADPH derivado da fotossíntese. Portanto, fatores que aumentam a eficiência fotossintética, provavelmente melhoram a eficiência do uso do nitrogênio (N). A nitrato redutase tem sido amplamente estudada, pois controla a síntese de proteínas em plantas que absorvem nitrato como principal fonte de N (Marschner, 2011).

Possivelmente, o inoculante de Azb aplicado via pulverização foliar teve um grande efeito sobre a nitrato redutase e aumentou a eficiência de uso do N aplicado via fertilização. Trabalhos conduzido por Aliasgharзад et al. (2014), na cultura do trigo, avaliando quatro cepas de Azb sob condições de déficit hídricos concluíram que todas as cepas bacterianas causaram um aumento significativo na atividade da enzima nitrato redutase em comparação ao tratamento sem inoculação. Já Cadore et al. (2016), em estudo na cultura do milho não detectaram efeito da inoculação com Azb nas sementes para a variável atividade da enzima nitrato redutase.





**Figura 10.** - Produção de massa seca de folha (Folha) (g/vaso) (A), caule (g/vaso) (B), produção total (g/vaso) (C) e relação folha/colmo (F/C) (D) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Equações de regressão:  $^{(sem)}y = 8,4535x + 3646,7$   $R^2 = 0,82$ ;  $^{(pulv)}y = 4,2608x + 4406,1$   $R^2 = 0,76$ ;  $^{(sem)}y = 0,0411x^2 - 3,0571x + 1603,7$   $R^2 = 0,81$ ;  $^{(pulv)}y = 3,506x + 1619,4$   $R^2 = 0,99$ ;  $^{(sem)}y = 10,326x + 5184,7$   $R^2 = 0,95$ ;  $^{(pulv)}y = 7,7668x + 6025,5$   $R^2 = 0,91$ ;  $^{(sem)}y = -0,0001x^2 + 0,0182x + 2,1735$   $R^2 = 0,80$ ;  $^{(pulv)}y = -0,0026x + 2,719$   $R^2 = 0,78$

A relação folha/colmo que foi maior quando o Azb foi utilizado de forma pulverizado quando não houve adubação de N, se inverteu quando foram utilizadas as doses de 40 e 80 kg de ha<sup>-1</sup>, na dose de 120 kg de ha<sup>-1</sup> não houve efeito significativo (figura 10). Em relação à adubação de N ocorreu efeito linear crescente para produção de folha, colmo e, conseqüentemente, para produção total, independente da forma de aplicação do Azb (figura 10). Como já explicado no experimento anterior, o efeito positivo da adubação nitrogenada sobre o aumento da produção de parte aérea de forragens já foi constatado por vários estudos.

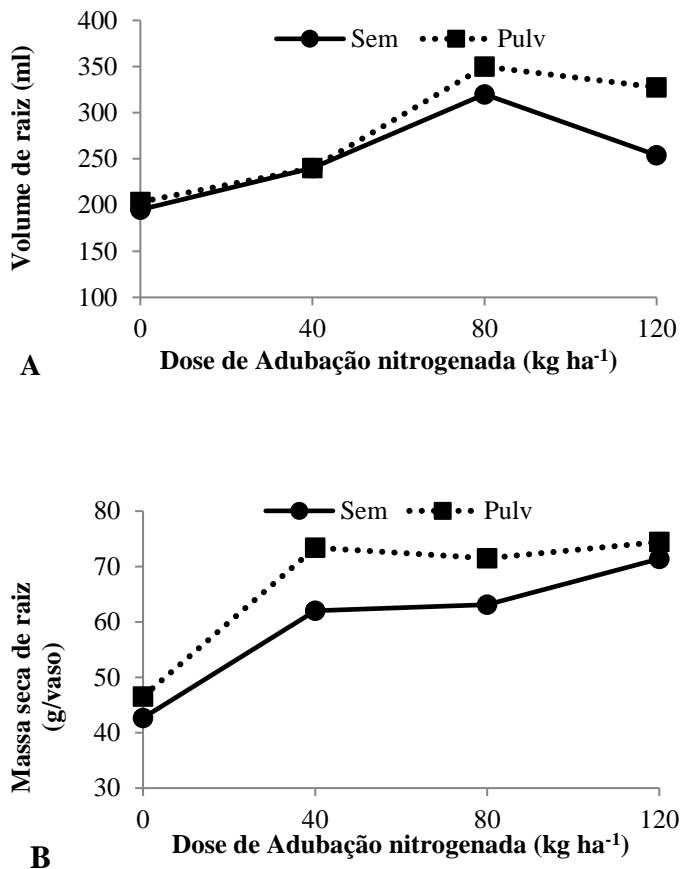
Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) para volume de raiz (ml) e massa seca de raiz (g/vaso) em função da forma de aplicação de Azb e uso da adubação de N (figura 11).

Em relação ao volume de raiz (ml) podemos observar que houve diferença significativa em relação à forma de aplicação do inoculante a partir da dose de 80 kg de ha<sup>-1</sup>. Onde, quando o inoculante foi aplicado de forma pulverizada os aumentos foram de 8,57 e 22,49% para 80 e 120 kg de ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Em relação à adubação de N, houve efeito quadrático independente da forma de aplicação do inoculante (figura 11).

A massa seca de raiz (g/vaso) foi superior estatisticamente nas doses de 40 e 80 kg de ha<sup>-1</sup> quando o Azb foi aplicado de forma pulverizada. Em relação à adubação de N houve efeito linear crescente independente da forma de aplicação (figura 11).

Segundo Okon e Vanderleyden. (1997), os efeitos positivos proporcionados por Azb são derivados principalmente das mudanças morfológicas e fisiológicas nas raízes de plantas inoculadas, causando um aumento na absorção de água e nutrientes. A inoculação com Azb

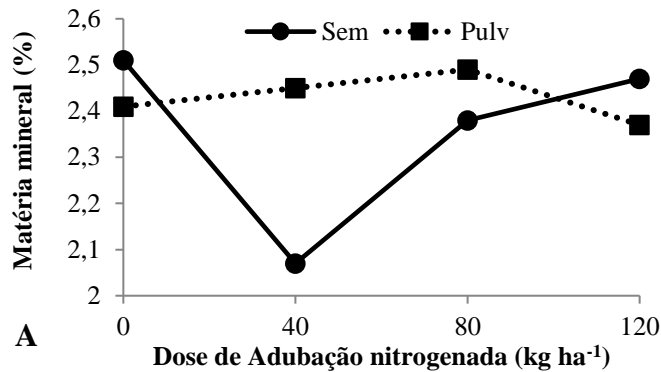
modifica o sistema radicular por um mecanismo ou mecanismos ainda não totalmente estabelecidos, mas isso é atribuído, pelo menos em parte, à produção pelas bactérias de substâncias que regulam o crescimento das plantas (fitohormônios), levando ao aumento do número de raízes laterais e pelos radiculares, aumentando a superfície disponível para captação de nutrientes e fluxo de prótons na membrana radicular, o que promove a captação de água e minerais.



**Figura 11.** - Volume de raiz (Vol. Raiz) (ml) (A) e massa seca de raiz (MS raiz) (g/vaso) (B) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Equações de regressão:  $^{(sem)}y = -0,0174x^2 + 2,7257x + 185,94$   $R^2 = 0,80$ ;  $^{(pulv.)}y = -0,0092x^2 + 2,3157x + 193,04$   $R^2 = 0,86$ ;  $^{(sem)}y = 0,2182x + 46,708$   $R^2 = 0,86$ ;  $^{(pulv.)}y = -0,0037x^2 + 0,6532x + 48,217$   $R^2 = 0,90$

A interação foi significativa ( $P < 0,05$ ), para forma de aplicação de Azb e uso do fertilizante nitrogenado para os teores de matéria mineral (MM) (figura 12).



**Figura 12.** - Teores de matéria mineral (MM) (A) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada.

Equações de regressão:  $^{(sem)}y = 8E-05x^2 - 0,0095x + 2,4615$   $R^2 = 0,6049$

Para as variáveis matéria seca (MS), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN<sub>CP</sub>) e fibra em detergente ácido (FDA) houve redução nos teores quando o inoculante foi aplicado de forma pulverizada, sendo que o contrário aconteceu com carboidratos não fibrosos (CNF) ( $P < 0,05$ ). O teor de MS diminuiu de acordo o aumento na produção e maior a qualidade da forragem, levando a menores proporções de tecidos de sustentação, como observamos na diminuição dos teores de FDN<sub>CP</sub> e FDA e aumento no teor de CNF. Em relação à adubação nitrogenada o teor de MS e FDN<sub>CP</sub> foi linear negativo. Já para PB houve efeito linear positivo a medida que aumentou a dose de adubação (tabela 11).

Tabela 11 – Composição bromatológica de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Item	FA <sup>1</sup>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	*Sem.	**Pulv.	0	40	80	120		FA	N <sup>2</sup>	FAxN <sup>3</sup>
MS <sup>4</sup>	28,54a	26,66b	29,24	28,13	26,68	26,33	3,02	0,0001	0,0001	0,1720
EE	1,77	1,55	1,66	1,56	1,60	1,83	24,66	0,1445	0,5804	0,9690
PB <sup>5</sup>	10,01	10,59	8,48	9,78	11,04	11,91	8,55	0,0806	0,0001	0,1369
FDN <sub>cp</sub> <sup>6</sup>	66,13a	63,19b	67,89	64,96	63,21	62,59	2,98	0,0003	0,0001	0,9783
FDA <sup>7</sup>	36,10a	32,14b	38,78	33,28	31,82	32,61	7,03	0,0001	0,0001	0,5861
Lignina	4,17	4,28	4,03	4,23	4,12	4,52	23,61	0,7636	0,7761	0,9990
CNF	19,29b	20,76a	19,13	19,96	20,55	20,45	7,79	0,0148	0,2780	0,4802
CT	85,58	84,90	87,40	85,77	83,76	83,84	7,79	0,1564	0,2780	0,4802

Médias seguidas por letras distintas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV: Coeficiente de variação. <sup>1</sup>Forma de aplicação; <sup>2</sup>Adubação nitrogenada; <sup>3</sup>Efeito de interação entre a forma de aplicação e adubação nitrogenada. Matéria seca (MS), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN<sub>CP</sub>), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, carboidratos não fibrosos (CNF) e carboidratos totais (CT). \*Inoculação via semente. \*\*Inoculação por pulverização.

<sup>4</sup> $y = -0,0254x + 29,122$   $R^2 = 0,9543$ ; <sup>5</sup> $y = 0,0289x + 8,57$   $R^2 = 0,9922$ ; <sup>6</sup> $y = -0,0441x + 67,31$   $R^2 = 0,9211$ ; <sup>7</sup> $y = 0,001x^2 - 0,1679x + 38,691$   $R^2 = 0,9947$

Não houve efeito significativo para a forma de aplicação do inoculante para as frações A, B1+B2, B3 e C da proteína do *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (tabela 12). ( $P>0,05$ ), e apesar de observarmos numericamente aumentos ou decréscimo de acordo a adubação nitrogenada, não houve efeito significativo para as frações A, B1+B2 e B3 ( $P>0,05$ ) (tabela 12). Observamos diferença significativa ( $P<0,05$ ) para fração C, sendo menor quando o inoculante foi aplicado via pulverização. Em relação adubação nitrogenada ocorreu uma queda na fração C quando foi utilizada a adubação. A fração C que é a fração não degradado no rumen, Sniffen et al. (1992), então é observado aumento na qualidade da proteína à medida que se aumentou a dose de N aplicada.

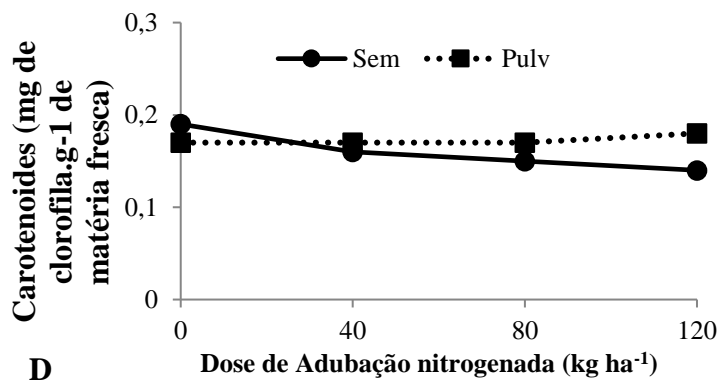
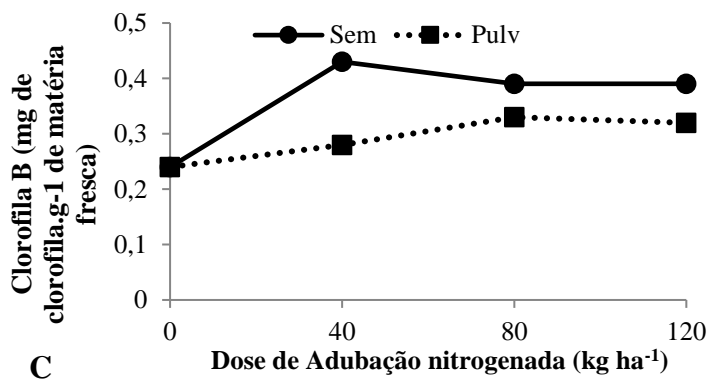
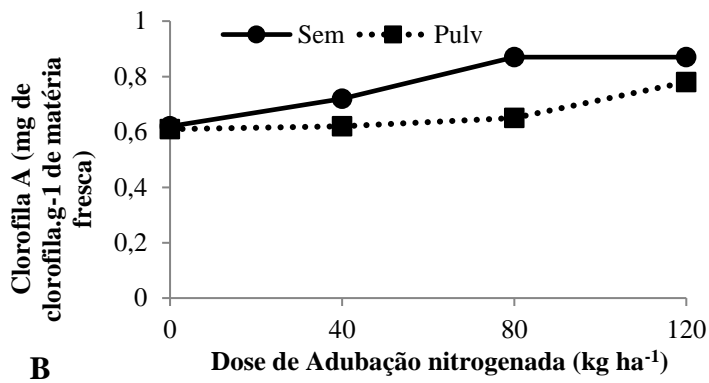
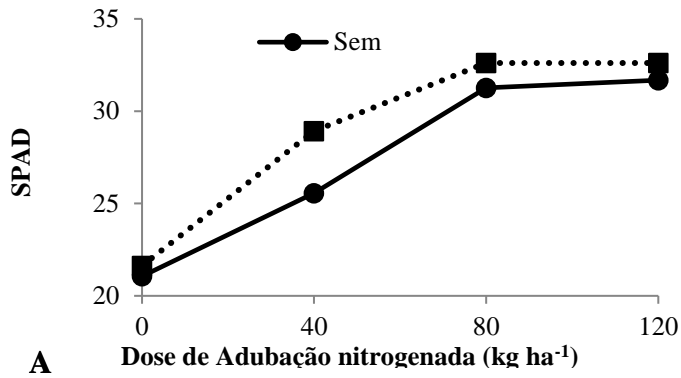
Tabela 12 – Frações A, B1+B2, B3 e C da proteína de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Item	FA <sup>1</sup>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	*Sem.	**Pulv.	0	40	80	120		FA	N <sup>2</sup>	FAxN <sup>3</sup>
Fração A	23,32	24,42	21,72	23,65	25,18	23,92	10,85	0,2390	0,0676	0,2285
Fração B1+B2	53,10	50,57	50,00	52,74	53,36	53,24	10,93	0,2218	0,5432	0,5602
Fração B3	13,81	16,30	17,33	14,82	13,09	13,97	25,25	0,0784	0,1460	0,2496
Fração C <sup>7</sup>	9,78a	9,25b	11,39	9,46	8,37	8,87	8,07	0,0023	0,0030	0,0457

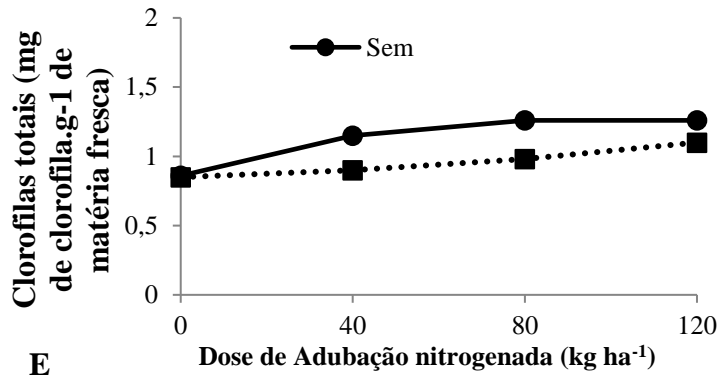
Médias seguidas por letras distintas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ). CV: Coeficiente de variação. <sup>1</sup>Forma de aplicação; <sup>2</sup>Adubação nitrogenada; <sup>3</sup>Efeito de interação entre a forma de aplicação e adubação nitrogenada. \*Inoculação via semente. \*\*Inoculação por pulverização.

<sup>4</sup> $y = -0,0216x + 10,82R^2 = 0,7132$

A interação foi significativa ( $P<0,05$ ), para forma de aplicação de Azb e uso do fertilizante nitrogenado para índice SPAD e teores clorofila a, clorofila b, carotenoides e clorofilas totais (figura 13). Independente da forma de aplicação do Azb houve aumentos nos valores de índice SPAD, clorofila a e b. Pois, o nitrogênio é constituinte da molécula de clorofila, geralmente existindo correlação entre seu uso e o aumento do teor de clorofila nas folhas (Furlani Junior et al., 1996). Campos et al. (2008) relataram maior teor de clorofila nas plantas de soja, devido ao fato de citocininas e giberelinas inibirem a degradação da clorofila. Já sabemos que um dos fatores das bactérias Azb serem consideradas bactérias promotoras de crescimento em plantas é a produção de fitohormônios, além da ação fixadora de nitrogênio no solo.







**Figura 13.** - Índice SPAD (A) e teores clorofila A (mg de clorofila.g-1 de matéria fresca) (B), clorofila B (mg de clorofila.g-1 de matéria fresca) (C), carotenoides (mg de clorofila.g-1 de matéria fresca) (D) e clorofilas totais (mg de clorofila.g-1 de matéria fresca) (E) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Equações de regressão:  $^{(sem)}y = 0,0964x + 21,856$   $R^2 = 0,87$ ;  $^{(pulv.)}y = 0,0923x + 23,43$   $R^2 = 0,84$ ;  $^{(sem)}y = 0,0023x + 0,635$   $R^2 = 0,90$ ;  $^{(pulv.)}y = 0,0014x + 0,584$   $R^2 = 0,79$ ;  $^{(sem)}y = -4E-05x^2 + 0,005x + 0,2515$   $R^2 = 0,87$ ;  $^{(pulv.)}y = 0,0007x + 0,249$   $R^2 = 0,83$ ;  $^{(sem)}y = -0,0004x + 0,18$   $R^2 = 0,76$ ;  $^{(pulv.)}y = 2E-06x^2 - 0,0001x + 0,1705$   $R^2 = 0,9333$ ;  $^{(sem)}y = 0,0033x + 0,936$   $R^2 = 0,8014$

Houve diferença significativa em relação à forma de aplicação do inoculante, onde quando aplicado de forma pulverizada teve uma maior razão, sendo 11,27% maior (tabela 13). Os valores da relação de clorofila a/b reduziram linearmente em relação às doses de N. Isso ocorreu devido ao aumento da clorofila b (figura 10), para o qual houve crescimento linear com a adição de N. O aumento no teor da clorofila b com o aumento das doses de N pode aumentar a eficiência do processo fotossintético na captação e transferência de energia para os centros de reação, pois, a clorofila b atua como pigmento auxiliar, presente no complexo antena dos fotossistemas, potencializando a transferência de energia de excitação para os centros de reação Barbieri Junior (2009). Dessa forma, pode-se concluir que o aumento da clorofila b é importante para a maior produção.

Tabela 13 – Razão das clorofilas A/B de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

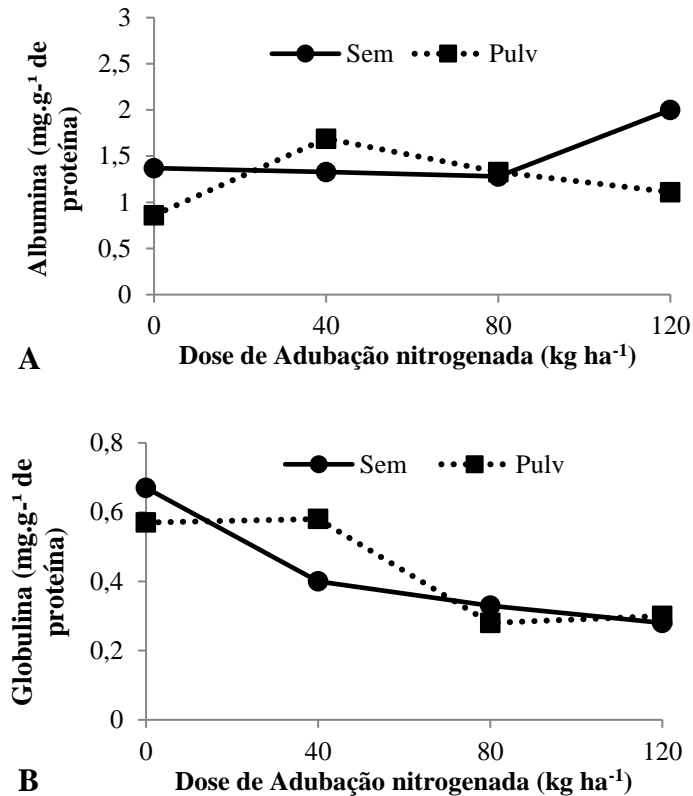
Item	FA <sup>1</sup>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	*Sem.	**Pulv.	0	40	80	120		FA	N <sup>2</sup>	FAxN <sup>3</sup>
Razão A/B <sup>4</sup>	2,44b	2,75a	3,25	2,33	2,25	2,25	11,77	0,0001	0,0402	0,1445

Médias seguidas por letras distintas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação. <sup>1</sup>Forma de aplicação; <sup>2</sup>Adubação nitrogenada; <sup>3</sup>Efeito de interação entre a forma de aplicação e adubação nitrogenada. \*Inoculação via semente.\*\*Inoculação por pulverização.

$$^4y = -0,0077x + 2,982 \quad R^2 = 0,6636$$

A interação foi significativa (P<0,05), para forma de aplicação de Azb e uso da adubação de N para as frações de albumina e globulina. Sem o uso da adubação nitrogenada

foi observado maior valor para a aplicação do Azb via semente o mesmo efeito foi encontrado para a dose de 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, esse efeito se inverteu para a dose de 40 kg de N ha<sup>-1</sup> (figura 14). Em relação à adubação de N houve efeito quadrático positivo via semente e negativo com a aplicação pulverizada.



**Figura 14.** - Teores de Albumina (mg.g<sup>-1</sup> de proteína (A) e globulina (mg.g<sup>-1</sup> de proteína) (B) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Equações de regressão:  $(^{Sem})y = 0,0001x^2 - 0,0097x + 1,409$   $R^2 = 0,91$ ;  $(^{Pulv.})y = -0,0002x^2 + 0,0207x + 0,93$   $R^2 = 0,762$ ;  $(^{sem})y = -0,0031x + 0,606$   $R^2 = 0,85$ ;  $(^{pulv.})y = -0,0028x + 0,599$   $R^2 = 0,76$

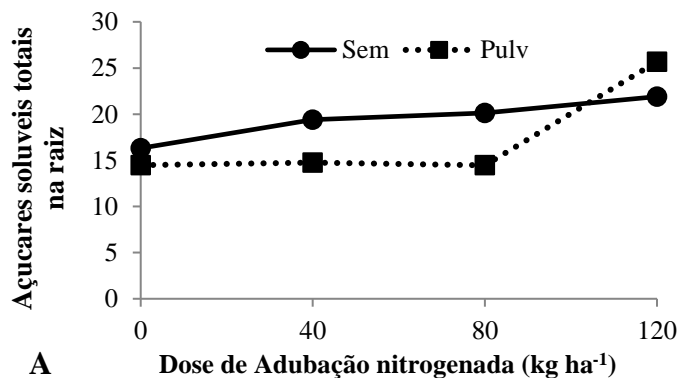
Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação à forma de aplicação do Azb para glutelina, sendo maior 27% quando aplicado de forma pulverizada (tabela 14). As glutelinas são um grupo de proteínas consideradas estruturais e seu aumento está relacionado ao ritmo de crescimento das gramíneas, resultando em maior demanda de suporte estrutural para novos tecidos (Shewry e Casey, 1999; Costa et al., 2008; Dupas et al., 2010).

Tabela 14 – Teores de prolamina e glutelina (mg.g<sup>-1</sup> de proteína) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Item	FA <sup>1</sup>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	*Sem.	**Pulv.	0	40	80	120		FA	N <sup>2</sup>	FAxN <sup>3</sup>
Prolamina <sup>4</sup>	0,25	0,28	0,18	0,23	0,31	0,34	15,47	0,9787	0,0001	0,0020
Glutelina <sup>5</sup>	0,55b	0,76a	0,69	0,66	0,78	0,50	18,85	0,0559	0,0001	0,5488

Médias seguidas por letras distintas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação. <sup>1</sup>Forma de aplicação; <sup>2</sup>Adubação nitrogenada; <sup>3</sup>Efeito de interação entre a forma de aplicação e adubação nitrogenada. \*Inoculação via semente. \*\*Inoculação por pulverização.

A interação foi significativa (P>0,05), para forma de aplicação de Azb e uso da adubação de N para açúcares solúveis totais (AST) na raiz. Onde nas doses 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N a AST foi maior quando o Azb foi inoculado via semente (figura 15). Em relação às doses de N houve aumento linear de acordo o aumento da dose de adubação. Consequência de um maior crescimento vegetal e aumento de área foliar, levando a uma maior produção de fotoassimilados.



**Figura 15.** - Açúcares solúveis totais da raiz (AST raiz) (A) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Equações de regressão:  $(^{sem})y = 0,0438x + 22,06$   $R^2 = 0,94$ ;  $(^{pulv.})y = 0,0859x + 22,741$   $R^2 = 0,67$

Observamos diferença significativa (P<0,05), entre as formas de aplicação do Azb para AST na folha e colmo, com valores superiores quando a aplicação foi pulverizada. Para a adubação de N houve efeito linear crescente (P<0,05) para AST na folha e colmo, além de amido na raiz (tabela 15).

O N é muito requisitado pelas plantas uma vez que é constituinte de aminoácidos, proteínas e clorofila, a falta de nitrogênio e clorofila significa que a planta conseguirá utilizar com eficiência a luz do sol como fonte de energia para funções essenciais como a absorção de nutrientes e a produção de carboidratos para o desenvolvimento (Lima et al., 2001). Levando

a um maior crescimento vegetal e aumento de área foliar, conseqüentemente a uma maior produção de fotoassimilados. Assim, sua maior disponibilização de N para a cultura pode promover incrementos no acúmulo de carboidratos pela planta (Kerbaui,2012) inclusive de reserva, como foi a resposta neste experimento para amido no colmo e raiz.

Tabela 15 – Açúcares solúveis totais (AST) em folha e colmo, amido (Am) no colmo e raiz em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Item	FA <sup>1</sup>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	*Sem.	**Pulv.	0	40	80	120		FA	N <sup>2</sup>	FAxN <sup>3</sup>
AST folha <sup>4</sup>	55,02b	56,90a	48,37	57,30	55,90	62,25	15,72	0,0001	0,0002	0,7826
AST colmo <sup>5</sup>	35,24b	52,10a	31,04	45,16	46,83	51,65	10,87	0,0001	0,0018	0,1146
Am. colmo	5,34	5,90	4,09	6,06	6,34	5,99	14,73	0,7063	0,5562	0,8742
Am.raiz <sup>6</sup>	10,70	9,96	8,73	10,44	10,87	11,29	14,73	0,0655	0,0001	0,9967

Médias seguidas por letras distintas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV: Coeficiente de variação. <sup>1</sup>Forma de aplicação; <sup>2</sup>Adubação nitrogenada; <sup>3</sup>Efeito de interação entre a forma de aplicação e adubação nitrogenada. \*Inoculação via semente. \*\*Inoculação por pulverização.

<sup>4</sup>y = 0,1006x + 49,919 R<sup>2</sup> = 0,818; <sup>5</sup>y = 0,1588x + 34,145 R<sup>2</sup> = 0,8565; <sup>6</sup>y = 0,0203x + 9,116 R<sup>2</sup> = 0,8688

A interação foi significativa (P<0,05), para forma de aplicação de Azb e uso da adubação de N para índice de área foliar (IAF). Onde observamos valores superiores quando o Azb foi aplicado via pulverização, e recebeu adubação (figura 16). Segundo Cairo, Oliveira & Mesquita (2008), o índice de área foliar está relacionado à densidade foliar de determinada área, e cresce intensamente até atingir o valor máximo, podemos observar neste experimento que, o índice de área foliar chegou ao seu valor máximo, apresentando comportamento linear crescente.

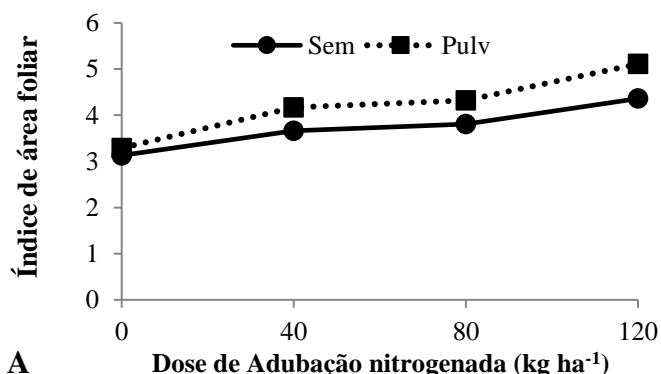


Figura 16. - Índice de área foliar (IAF) (A) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Equações de regressão: <sup>(sem)</sup>y = 0,0438x + 22,06 R<sup>2</sup> = 0,94; <sup>(pulv.)</sup>y = 0,0859x + 22,741 R<sup>2</sup> = 0,67

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre as formas de aplicação do Azb para área foliar (AF) ( $\text{dm}^2$ ), a maior área foliar foi observada quando o inoculante foi aplicado de forma pulverizada. Em concordância com a maior produção de folhas (tabela 16). Em relação à adubação de N houve efeito linear crescente para ( $P < 0,05$ ), AF e área foliar específica (AFE). A AFE é utilizada como indicador da espessura foliar, uma vez que é a relação entre área foliar e peso da folha. Dessa forma, podemos inferir que o aumento na produção de massa seca de folha (figura 7) se deu pelo maior tamanho e ou maior quantidade de folhas e não pelo seu peso ou espessura. houve efeito quadrático para razão área foliar (RPF) (tabela 16).

Tabela 16 – Área foliar (AF) ( $\text{dm}^2$ ), área foliar específica (AFE) ( $\text{dm}^2 \text{g}^{-1}$ ), Razão área foliar (RAF) ( $\text{dm}^2 \text{g}^{-1}$ ) e razão peso foliar (RPF) de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função da forma de aplicação de *Azospirillum brasilense* e uso da adubação nitrogenada

Item	FA <sup>1</sup>		Nitrogênio				CV	P-valor		
	*Sem.	**Pulv.	0	40	80	120		FA	N <sup>2</sup>	FAxN <sup>3</sup>
AF <sup>1</sup>	28,77b	29,23a	23,07	29,05	31,10	32,80	8,05	0,0189	0,0001	0,2195
AFE <sup>2</sup>	0,48	0,45	0,43	0,47	0,48	0,49	19,22	0,4125	0,0069	0,3937
RAF	0,34	0,36	0,31	0,37	0,36	0,37	10,27	0,0854	0,0599	0,1545
RPF <sup>4</sup>	0,75	0,76	0,72	0,78	0,76	0,75	10,30	0,0933	0,0041	0,3663

Médias seguidas por letras distintas na linha divergem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV: Coeficiente de variação. <sup>1</sup>Forma de aplicação; <sup>2</sup>Adubação nitrogenada; <sup>3</sup>Efeito de interação entre a forma de aplicação e adubação nitrogenada. \*Inoculação via semente. \*\*Inoculação por pulverização.

<sup>1</sup> $y = 0,0781x + 24,319$   $R^2 = 0,9034$ ; <sup>2</sup> $y = 0,0005x + 0,4402$   $R^2 = 0,8339$ ; <sup>3</sup> $y = -1E-05x^2 + 0,0015x + 0,7245$   $R^2 = 0,784$

## V – CONCLUSÃO

O inoculante contendo bactérias *Azospirillum brasilense* pode ser associado ao uso da adubação nitrogenada, apresentando aumento na produção total do *Brachiaria brizantha* CV. Marandu até o máximo nível de adubação nitrogenada utilizado no presente trabalho. Sendo recomendado a forma de aplicação pulverizada.

## VI – REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. M.; KYRIAZOPOULOS, A. P.; PARISSI, Z. M.; KOSTOPOULOU, P.; KARATASSIOU, M.; ANJALANIDOU, K.; KATSOUTA, C. Growth, dry matter production, phenotypic plasticity, and nutritive value of three natural populations of *Dactylis glomerata* L. under various shading treatments. **Agroforestry systems**, v.88, n.2, p.287-299, 2014.

ALIASGHARZAD, N.; HEYDARYAN, Z.; SARIKHANI, M. R. Azospirillum inoculation alters nitrate reductase activity and nitrogen uptake in wheat plant under water deficit conditions. **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**, Padang, v. 4, n. 4, p. 94-98, 2014.

ALVAREZ V., V.H.; RIBEIRO, A.C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de minas gerais (CFSMG). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. **5ª aproximação**, Viçosa, 1999.

AVICE, J. C., LE DILY, F., GOULAS, E., NOQUET, C., MEURIOT, F., VOLENEC, J. J., CUNNINGHAM, S. M., SORS, T. G., DHONT, C., CASTONGUAY, Y., NADEAU, P., BÉLANGER, G., CHALIFOUR, F. P. & OURRY, A. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. **Canadian Journal of Botany**, 81, 1198–1212. 2003.

AZIZI, P.; RAFII, M. Y.; MAZIAH, M.; ABDULLAH, S. N. A.; HANAFI, M. M.; LATIF, M. A.; RASHID, A. A.; SAHEBI, M. Understanding the shoot apical meristematic regulation: A study of the phytohormone, auxin and cytokinin, in rice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.135, p.1-15, 2015.

BARBERO, L.M. et al . Produção animal e valor nutritivo da forragem de pastagem de coastcross consorciada com amendoim forrageiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 62, n. 3, p. 645-653.

BARBIERI JUNIOR, E. Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o nitrogênio foliar e a biomassa em capim-tifton 85. 2009. 49 f. **Dissertação**

BASRA, S. M. A.; IQBAL, S.; AFZAL, I. Evaluating the response of nitrogen application on growth, development and yield of quinoa genotypes. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.16, n.5, p.886-892, 2014.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.

CABRERA-BOSQUET, L., ALBRIZIO, R., ARAUS, J. L. & NOGUES S. Photosynthetic capacity of field-grown durum wheat under different availabilities C: A comparative study from leaf to canopy. **Environmental and Experimental Botany**, 67, 145-152. 2009.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v.115, p.151-153, 1989.

CADORE, R.; NETTO, A. P. C.; REIS, E. F.; RAGAGNIN, V. A.; FREITAS, D. S.; LIMA, T. P.; ROSSATO, M.; D'ABADIA, A. C. A. Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* brasileiro sob diferentes doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 15, n. 3, p. 399-410, 2016.

CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras. **Revista Biotemas**, 21 (3), setembro de 2008.

CHAPMAN, D. F.; LEMAIRE, G. Morphogenic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. In: BAKER, M. J. (Ed.). **Grasslands for our world**. Wellington: SIR, p. 55-64. 1993.

COSTA, K. A. P., FAQUIN, V., OLIVEIRA, I. P., ARAUJO, J. L. & RODRIGUES, R. B. Nitrogen doses and sources in marandu pasture. II - Nutrition nitrogen plant. **Journal of Soil Science**, 32, 1601-1607. 2008.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ A. BERCHIELLI, T.; SALIBA, E... & AZEVEDO, J.. Métodos para análise de alimentos – INCT – **Ciência Animal**. Instituto Nacional de Ciência Tecnologia de Ciência Animal. Cap. 15, 2012.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. Carbohydrate chemistry. New York: **Academic Press**, p.477-520. 1962.

DOAA, M. R.; BASHA, B.; EL-AILA, H. I. Response of Foliar Spraying with Amino Acids and Integrated use of Nitrogen Fertilizer on Radish (*Raphanus sativus* L.) Plant. **International Journal of ChemTech Research**, v.8, n.11, p.135-140, 2015.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum* brasileiro wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, n. 1, pp. 155-164, 1999.

DONATO, V.M.T.S. et al. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1087-1093, 2004.

DUPAS, E., BUZETTI, S., SARTO, A.L., HERNANDEZ, F.B.T. & BERGAMASCHINE, A.F. (2010). Dry matter yield and nutritional value of Marandu grass under nitrogen fertilization and irrigation in cerrado in São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 2598-2603.



EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; ZIMMER, A.H.; MEDEIROS, R.N.; OLIVEIRA, M.P. Características do pasto de capim-tanzânia adubado com nitrogênio no final do verão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1189-1198, 2007.

FERREIRA MMM; FERREIRA GB; FONTES PCR; DANTAS JP. 2006. Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. **Revista Ceres** 53: 83-92.

FURLANI JUNIOR, E.; NAKAGAWA, J.; BULHÕES, L.J.; MOREIRA, J.A.A.; GRASSI FILHO, H. Correlação entre leituras de clorofila e níveis de nitrogênio aplicados em feijoeiro. **Bragantia**, v.55, p.171-175, 1996.

FUKAMI, J., OLLERO, F.J., MEGÍAS, M. ET AL. Phytohormones and induction of plant stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Expr** 7, 153 (2017).

GARCEZ NETO, A., NASCIMENTO JÚNIOR, D. & REGAZZI, A. J. Respostas morfológicas e estruturais de *Panicum maximum* cv. Mombaça sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e alturas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31(5), 1890-1900. 2002.

GIL PT; FONTES PCR; CECON PR; FERREIRA FA. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade de batata. **Horticultura Brasileira** 20: 611-615. 2002.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, n.12, p.1332-1334, 1979.

KERBAUY, Gilberto Barbante. Fisiologia vegetal 2.ed [reimp.] . Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 431 p. 2012.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In:ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: **Centro Internacional de Agricultura Tropical**,. p. 41-78. 1991.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; van SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.

LOPES, M. N., CÂNDIDO, M. J. D., POMPEU, R. C. F. F., SILVA, R. G., LOPES, J. W. B., FERNANDES, F. R. B., BEZERRA, F. M. L. Fluxo de biomassa em capim-massai durante o estabelecimento e rebrotação com e sem adubação nitrogenada1. **Revista Ceres**, 60(3), 363-371. 2013.

LOPES, W. B.; CARVALHO, G. G. P.; PATÊS, N. M. S.; PIRES, A. J. V.; MACÊDO, T. M.; FRIES, D. D.; SALES, R. M. P. Dinâmica, produção e qualidade da *Brachiaria brizantha* submetida a regime hídrico e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.12, n.1, p.43-58, 2011.

MAGALHÃES, J.A.; CARNEIRO, M.S. DE S.; ANDRADE, A.C.; PEREIRA, E.S.; SOUTO, J.S.; PINTO, M.S. DE C.; RODRIGUES, B.H.N.; COSTA, N. DE L.; MOCHEL

- FILHO, W. DE J.E. Nitrogen use efficiency, yield and composition of andropogon-grass under irrigation and fertilization. **Archivos de zootecnia**, vol. 61, núm. 236, p. 578.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N.F. Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: **ARTMED**, 451P. 2005.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd ed. **Academic Press**. 672p. 2011.
- MARTUSCELLO, J.A.; MAJEROWICZ, N.; CUNHA, D.N.F.V. da; AMORIM, P.L. de & BRAZ, T.G.S. Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada. **Arquivo de Zootecnia**. v.65, n.252, p.565-570, 2016.
- MILLER, S. S. Plant Bioregulators in Apple and Pear Culture. In: J. JANICK. (Ed). **Horticultural Reviews**: Hoboken, NJ, USA, v.10, 1988.
- MIYAUCHI, M.Y.H.; LIMA, D.S.; NOGUEIRA, M.A.; LOVATO, G.M.; MURATE, L.S.; CRUZ, M.F.; FERREIRA, J.M.; ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Science Agriculture**, v.65, p.525-531, 2008.
- OKON, Y.; GONZALEZ-LABANDERA, C.A. Agronomic applications of Azospirillum. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, G.D. (Eds.). Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. **CSIRO – Division of Soils**, Australia. p.274-278. 1994.
- PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, C. A. M.; CASTRO, C. R. T.; MAURICIO, R. M.; FERNANDES, P. B.; MORENZ, M. J. F. Morphogenesis, biomass and nutritive value of *Panicum maximum* under different shade levels and fertilizer nitrogen rates. **Grass and Forage Science**, v.72, n.3, p.590-600, 2017.
- SHEWRY, P.R. & CASEY, R. *Seed Proteins*; **Springer Science and Business Media LLC**: Berlin, Germany, 1–10. 1999.
- SILVA, M. F.; PORTO, E. M. V.; ALVES, D. D.; VITOR, C. M. T.; ASPIAZÚ, I. Morphogenetic characteristics of three *Brachiaria brizantha* cultivars submitted to nitrogen fertilization. **Anais de Academia Brasileira em Ciências**, v.85, n.1, p.371-377, 2013.
- SILVA, M. M., MALDONADO, H., BRESSAN-SMITH, R. E., COELHO, J. F., & D AVILA, E.. Diferenças varietais nas características fotossintéticas de *Pennisetum purpureum* Schum. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1975-1983, 2001.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, D.J.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 888 p. 2017.
- TEIXEIRA, SORAIA OLIVASTRO ET AL . Doses de fósforo e nitrogênio na produção de *Brachiaria* híbrida cv. Mulato II. **Rev. Ceres**, Viçosa , v. 65, n. 1, p. 28-34, Feb. 2018 .
- VIANA, M. C. M.; FREIRE, F. M.; FERREIRA, J. J.; MACÊDO, G. A. R.; CANTARUTTI, R. B.; MASCARENHAS, M. H. T. Adubação nitrogenada na produção e composição química

do capim-braquiária sob pastejo rotacionado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, p.1497-1503, 2011.

VITOR, C.M.T.; FONSECA, D.M.; COSER, A.C. et al. Produção de matéria seca e valor nutritivo de pastagem de capim-elefante sob irrigação e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.435-442, 2009.

VOLENEC, J. J., OURRY, A. & JOERN, B. C. A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. **Physiologia Plantarum**, 97, 185-193. 1996.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, n.3, p.307-313, 1994.

## VII – CONSIDERAÇÕES FINAIS

### **Experimento 1**

A inoculação de sementes de *Brachiaria brizantha* CV. Marandu com inoculante contendo bactérias *Azospirillum brasilense* contribui de forma positiva no desenvolvimento e produção do *Brachiaria brizantha*, com aumento em todas as variáveis produtivas de parte aérea e volume de raiz, além de melhorar a sua qualidade com aumentos de proteína bruta e queda nos teores de fibra em detergente neutro.

### **Experimento 2**

A aplicação do inoculante contendo bactérias *Azospirillum brasilense* de forma pulverizada no *Brachiaria brizantha* CV. Marandu aumenta a produção total das plantas, a massa seca e o volume de raiz quando comparada com a aplicação via semente. Além de melhorar a qualidade reduzindo os teores de matéria seca, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e aumentar o teor de carboidratos não fibrosos.